

(11) Número de Publicação: **PT 1303520 E**

(51) Classificação Internacional:

C07D 493/00 (2006.01) **C07D 319/12** (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01) **A61K 31/357** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.07.05**

(30) Prioridade(s): **2000.07.05 AU PP866500**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.04.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.09.26**
004/2008

(73) Titular(es):

**THE GOVERNMENT OF THE STATE OF
SARAWAK, MALAYSIA**
**TINGKAT 17, WISMA BAPA MALAYSIA, PETRA
JAYA 93502 KUCHING, SARAWAK MY**

(72) Inventor(es):

BARBARA MARTHA MEURER-GRIMES AU
JIN YU AU
GINO LUIGI VAIRO AU

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS TERAPÊUTICOS E MÉTODOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSTOS TERAPÊUTICOS E MÉTODOS"

A presente invenção proporciona compostos com um núcleo ciclopentabenzofurano e a utilização destes compostos em terapêutica bem como composições que compreendem os referidos compostos.

DESCRIÇÃO**"COMPOSTOS TERAPÊUTICOS E MÉTODOS"****ÁREA DA INVENÇÃO**

A presente invenção relaciona-se de um modo geral com compostos que têm um núcleo ciclopentabenzofurano. Mais particularmente, a presente invenção relaciona-se com compostos de ciclopentabenzofurano em que o núcleo ciclopentabenzofurano está substituído por uma unidade dioxaniloxi. A invenção também se relaciona com a utilização destes compostos em terapêutica e com composições que compreendem os referidos compostos.

ANTECEDENTES

Aglaias é um género grande da família Meliaceae que comprehende mais de 100 espécies (principalmente lenhosas) da região da Indo-Malásia e do Pacífico ocidental. A sua utilização inclui tratamento de febre, fracturas, parturição e inflamação. Os extractos são também utilizados como bactericidas, insecticidas, em perfumaria, e como um adstringente, tónico, refrigerante (*Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*) e para o tratamento de tumores abdominais (Pannell, et al., 1992, *Kew Bull.*, (16) 273-283).

Mais recentemente, vários linhanos 1H-ciclopenta-[b]benzofurano foram isolados da espécie *Aglaia* (ver, por exemplo, WO97/08161; JP 97171356; Ohse, et al., *J Nat Prod.*, 1996, 59 (7): 650-52; Lee et al., *Chem. Biol. Interact.*, 1998, 115 (3): 215-28; Wu et al., *J Nat. Prod.*, 1997, 60 (6): 606-08; Bohnenstengel et al., *Z. Naturforsch.*, 1999, 54c (12): 55-60 e Bohnenstengel et al., *Z. Naturforsch.*, 1999, 54c (12): 1075-83, Xu, Y. J., et al., 2000, *J. Nat. Prod.*, 63, 473-76. Detectou-se que vários destes compostos têm actividade insecticida (Janprasert, et al., 1993, *Phytochemistry*, 32 (1), 67-69; Ishibashi et al., 1993, *Phytochemistry*, 32 (2), 307310; Hiort, et al., 1999, *R Nat. Prod.*, 62 (12), 1632-1635). Compostos insecticidas com uma estrutura nuclear fortemente relacionada foram isolados a partir de *Aglaia roxburghiana* e estão descritos no WO 9604284 para utilização como agentes activos em formulações agro-químicas.

Foram agora isolados novos compostos (Composto A e B, aqui descritos) a partir de *Alaia leptantha*, Miq. (Meliaceae) que possuem unicamente um grupo dioxaniloxi ligado ao núcleo ciclopenta[b]benzofurano. Os compostos A e B mostraram apresentar efeitos citotóxicos e citoestáticos potentes no crescimento de linhas celulares de cancro e viabilidade e assim os compostos da invenção podem ser úteis como agentes terapêuticos no tratamento de cancro e patologias cancerosas ou de outras doenças associadas a hiperproliferação celular.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Ao longo desta descrição e reivindicações que se seguem, a menos que o contexto contrariamente o exija, o termo "compreende" e variações como "compreender" e "compreendendo" deverá ser entendido como implicando a inclusão de um número ou passo referidos ou grupo de números ou passos referidos mas não a exclusão de qualquer outro número ou passo ou grupo de números ou passos.

Num primeiro aspecto, a invenção relaciona-se com um composto de ciclopentabenzofurano ou um seu sal, derivado ou pro-fármaco como reivindicado na reivindicação 1.

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma composição que comprehende um composto de ciclopentabenzofurano ou um seu sal, derivado ou pro-fármaco, como reivindicado na reivindicação 1 conjuntamente com um veículo, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitáveis.

A invenção relaciona-se também com a utilização de um composto de ciclopentabenzofurano ou um seu sal, derivado ou pro-fármaco como reivindicado na reivindicação 1 na manufactura para o tratamento de cancro ou patologias cancerosas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: O Composto A promove a diferenciação de células de leucemia THP-1

Células THP-1 foram cultivadas durante 4 dias na presença ou ausência de 10 nM do Composto A como indicado. Onde as células apresentadas foram também tratadas com IFNy (100 ng/mL) (3 dias) ou com PMA (0,1 µM) (4 dias) na presença ou ausência do Composto A. As imagens são de células visualizadas por microscopia de contraste de fase (ampliação x 200).

Figura 2: Efeitos do Composto A na progressão do ciclo celular e viabilidade de células THP-1.

Células THP-1 foram cultivadas durante 2 dias com a concentração de Composto A indicada ou 1000 nM de paclitaxel e em seguida foram colhidas e fixadas em etanol a 70% antes de serem coradas com iodeto de propídio e o teor de ADN foi determinado por citometria de fluxo. Os números indicam a percentagem de células nas várias fases do ciclo celular em relação a todas as células com teor de ADN $\geq 2N$ e também a percentagem de células mortas (*i.e.* células subdiploides $\leq 2N$) à esquerda do marcador (a linha vertical) que surgiram durante o período de cultura.

Figura 3: Efeitos do Composto A na proliferação de células A549.

Células A549 foram nucleadas a 10 000 células/poço e cultivadas na presença das concentrações de Composto A indicadas ou paclitaxel. As células foram recolhidas e o número de células viáveis foi determinado por contagem com hemocitómetro de células coradas com azul de tripano em tempos diferentes. Os resultados são as médias \pm SEM de culturas triplicadas.

Figura 4: Efeitos do Composto A na progressão e viabilidade de células A549.

Células A549 foram cultivadas durante 6 dias com a concentração do Composto A indicada ou 1 μ M de paclitaxel e em seguida foram colhidas e fixadas em etanol a 70% antes de serem coradas com iodeto de propídio e o teor de ADN foi determinado por citometria de fluxo. Os números indicam a percentagem de células nas várias fases do ciclo celular em relação a todas as células com teor de ADN \geq 2N e também a percentagem de células mortas (*i.e.* células subdiploides \leq 2N) à esquerda do marcador (a linha vertical) que surgiram durante o período de cultura.

Figura 5: Os Compostos A e B induzem acumulação na fase G2/M de células de leucemia K562

Células K562 foram cultivadas durante 3 dias com

a concentração indicada dos Compostos A ou B e em seguida foram colhidas e fixadas em etanol a 70% antes de serem coradas com iodeto de propídio e o teor de ADN foi determinado por citometria de fluxo. Os números indicam a percentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular respectivamente em relação a todas as células com teor de ADN $\geq 2N$.

Figura 6: Os efeitos citostáticos do Composto A em células A549 são reversíveis

Células A549 foram nucleadas a 10 000 células/poço e foram cultivadas na presença das concentrações indicadas do Composto A ou paclitaxel e os números de células viáveis foram determinados por contagem com hemocitómetro de células coradas com azul de tripâno em vários tempos. No dia 5 algumas das células foram lavadas, ressuspensas em meio fresco isento dos vários tratamentos e foram cultivadas novamente durante mais 4 dias antes da contagem.

Figura 7: O Composto A inibe a citotoxicidade induzida por camptotecina e paclitaxel das células A549

Células A549 em placas de 96 poços foram cultivadas durante 3 dias na presença ou ausência de 10 μM de Composto A conjuntamente com as concentrações indicadas de (A) camptotecina ou (B) paclitaxel. A perda da integridade da membrana foi então avaliada pela adição do corante de

ligação a ADN YOYO-1 e a fluorescência aumentada que acompanhou a morte celular foi medida utilizando um leitor de placas fluorescentes.

Figura 8: O Composto A inibe a paragem do ciclo celular e a morte celular induzidas por agentes antineoplásicos mas não por estaurosporina.

Células A549 em placas de 6 poços foram cultivadas durante 3 dias na presença ou ausência de 10 μM de Composto A conjuntamente com 0,1 μM de camptotecina, 10 μM de vinblastina, 1 μM de paclitaxel ou 1 μM de estaurosporina como indicado. As células foram então colhidas e fixadas em etanol a 70% antes de serem coradas com iodeto de propídio e o teor de ADN foi determinado por citometria de fluxo. Os números indicam que a percentagem de células nas várias fases do ciclo celular em relação a todas as células com teor de ADN ≥ 2 N é também a percentagem de células mortas (*i.e.* células subdiploides $\leq 2N$) à esquerda do marcador com pontos que surgiram durante o período de cultura.

Figura 9: O Composto A não induz actividade de senescência associada a β -galactosidase em células A549.

Células A549 foram nucleadas a 10 000 células/poço em placas de 6 poços na presença ou ausência de diferentes concentrações do Composto A (10-50 μM) ou 250 μM de doxorubicina durante 10 dias antes do seu processamento

e de serem coradas de um dia para o outro para avaliar a actividade de senescênciia associada a β -galactosidase como anteriormente descrito (Dimri et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92 (20):9363-7). Para o Composto A apenas o tratamento com 10 μ M é apresentado mas não houve actividade de SA- β gal detectável a nenhuma das outras concentrações testadas. PC, microscopia de fase de contraste. BF, microscopia de campo luminoso. Ampliação x 200.

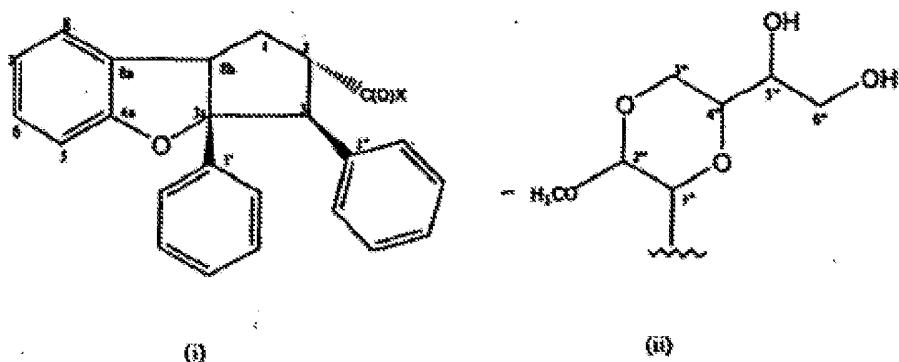
Figura 10: O Composto A inibe o crescimento de células tumorais humanas num modelo de xenoenxerto de murbanho.

Ratinhos sem pelo atípicos Balb/c (Rygard and Povis, 1969, *Acta Pathol Microbiol Scand*, 77: 758) foram inoculados subcutaneamente no flanco dorsal com 2×10^6 células PC3. O Composto A foi administrado (3 mg/kg) após oito dias quando os tumores se tornaram palpáveis por injecção intraperitoneal três vezes por semana. O Composto A foi primeiro solubilizado em etanol e em seguida foi misturado 1:1 com cremafor e diluído em soro fisiológico para injecção. Os animais de controlo foram tratados de forma análoga com o mesmo veículo mas sem o Composto A. (A) Efeito do Composto A no volume médio do tumor. Os volumes dos tumores foram medidos utilizando um calípero micrométrico nos tempos indicados. Os dados representam o volume médio do tumor \pm SEM (B) Efeito do Composto A na massa média do tumor. No final do ensaio (29 dias após a inoculação das células PC3) os ratinhos foram sacrificados,

os tumores foram excisados e em seguida pesados. Os dados representam o peso médio do tumor \pm SEM.

DESCRÍÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Vários ciclopenta[b]benzofuranos foram anteriormente referidos, Greger et al., 2001, *Phytochemistry*, 57, (1); 57-64. Os compostos A e B da presente invenção têm um grupo dioxanilo (ii) ligado a um núcleo ciclopenta[b]-benzofurano (i).



O grupo dioxanilo de Fórmula (ii) a partir de uma fonte natural não foi anteriormente descrito. Sem se pretender limitar a invenção pela teoria, acredita-se que a presença de um grupo de massa estereoquímica, i.e., espacialmente maior do que um grupo metoxi, pode conferir propriedades citotóxicas e citostática aos compostos que têm um núcleo ciclopenta[b]benzofurano.

O termo "sal, ou pro-fármaco" significa qualquer sal, éster, glicosídeo, solvato ou hidrato ou qualquer outro

composto farmaceuticamente aceitável, que ao ser administrado ao sujeito receptor seja capaz de proporcionar (directa ou indirectamente) um composto da invenção como aqui descrito.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de ácidos inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis como ácido clorídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfâmico e bromídrico, ou sais de ácidos orgânicos farmaceuticamente aceitáveis como ácido acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, mágico, glucónico, benzólico, succínico, oxálico, fenilacético, metanossulfónico, toluenossulfónico, benzenossulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutâmico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tânico, ascórbico e valérico. Os sais de base incluem, mas não se limitam aos formados com catiões farmaceuticamente aceitáveis, como sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, amónio e alquilamónio.

A preparação dos sais pode ser realizada por métodos conhecidos na técnica. Deverá ser também considerado que os sais que não são farmaceuticamente aceitáveis também estão dentro do âmbito da invenção, uma vez que podem ser úteis como intermediários na preparação de sais farmaceuticamente aceitáveis.

Os compostos da invenção podem estar em forma cristalina ou em forma de solvato (e.g., hidratos. Os

métodos de solução são conhecidos pelos especialistas na técnica.

Os pro-fármacos dos compostos A ou B estão também dentro do âmbito da invenção. O termo "pro-fármaco" inclui derivados que são convertidos *in vivo* nos compostos da invenção e incluem, por exemplo, derivados de éster, acetato e glicosídos de grupos hidroxilo livres.

A derivatização dos grupos hidroxilo dos Compostos A e B pode ser realizada por métodos conhecidos na técnica para alquilar, arilar ou acilar grupos hidroxilo, por exemplo como descrito em *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. Greene e P.G. M. Wultz, (1999) Wiley Interscience, Nova Iorque, e *Advanced Organic Chemistry*, J. March (4th edition), Wiley-InterScience. Por exemplo, os grupos hidroxilo podem ser alquilados utilizando halogenetos de alquilo como iodeto de metilo ou sulfatos de dialquilo como sulfato de dimetilo e sulfato de dietilo. A acilação pode ser realizada por tratamento com ácidos carboxílicos apropriados, halogenetos ácidos e anidridos ácidos na presença de uma base ou agente de acoplamento. A benzilação pode ser realizada por tratamento com um composto de halogeneto de benzilo como brometo de benzilo, cloro ou iodo. As desesterificação do éster metílico pode ser realizada por tratamento do éster com uma base aquosa. A esterificação de um ácido carboxílico pode ser conseguida por meios convencionais incluindo tratamento com um álcool apropriado na presença de ácido, ou tratamento com sulfatos de alquilo ou halogenetos de alquilo.

Tal como aqui utilizado, o termo "alquilo", quando utilizado só ou em termos compostos como "aril-alquilo", refere-se a um grupo hidrocarboneto de cadeia linear, ramificada ou cíclico, preferencialmente C₁₋₂₀, como C₁₋₁₀. O termo "C_{1-C₆} alquilo" refere-se a um grupo alquilo de cadeia linear ou ramificada com 1 a 6 átomos de carbono. Os exemplos de "C_{1-C₆} alquilo" incluem metilo, etilo, isopropilo, *n*-propilo, *n*-butilo, sec-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, 2,2-dimetipropilo, *n*-hexilo, 2-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 3-metilpentilo e 2,3-dimetilbutilo. Os grupos alquilo cílicos podem ter até 20 átomos de carbono, *e.g.*, até 20 átomos de carbono, *e.g.*, até 10 átomos de carbono. Os exemplos de C₁₋₆ alquilo cílico incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo e ciclohexilo. Outros exemplos de alquilo incluem: heptilo, 5-metil-hexilo, 1-metil-hexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetil-pentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, octilo, 6-metil-heptilo, 1-metil-heptilo, 1,1,3,3-tetrametilbutilo, nonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- ou 7-metil-octilo, 1-, 2-, 3-, 4- ou 5-etil-heptilo, 1-, 2- ou 3-propil-hexilo, decilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- e 8- metilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- ou 6-etiloctilo, 1-, 2-, 3- ou 4-propilheptilo, undecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-ou 9-metildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- ou 7-etilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4- ou 5- propilocitlo, 1-, 2- ou 3-butil-heptilo, 1-pentil-hexilo, dodecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-

ou 10-metilundecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- ou 8-etyldecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- ou 6-propilnonilo, 1-, 2-, 3- ou 4-butiloctilo, 1-2-pentil-heptilo e outros semelhantes. Os grupos alcenilo ou alquinilo podem ser lineares, ramificados ou cílicos (tendo pelo menos 2 átomos de carbono) e conter um, dois ou mais graus de insaturação, preferencialmente um C₂₋₂₀ alcenilo, mais preferencialmente um C₂₋₆ alcenilo, ou um C₂₋₂₀ alquinilo, mais preferencialmente um C₂₋₆ alquinilo.

O termo "arilo", quando utilizado só ou em termos compostos como "arilalquilo" denota resíduos simples, polinucleares, conjugados ou fundidos de hidrocarbonetos aromáticos. Heteroarilo denota resíduos simples, polinucleares, conjugados ou fundidos de sistemas de anel heterocíclicos aromáticos, em que um ou mais átomos de carbono de um resíduo de hidrocarboneto cílico está substituído com um heteroátomo para proporcionar um resíduo aromático. Quando dois ou mais átomos de carbono estão substituídos, isto pode ser por dois mais do mesmo heteroátomo ou por heteroátomos diferentes. Os heteroátomos adequados incluem O, N, S, e Se.

Os exemplos de "arilo" ou "heteroarilo" incluem fenilo, bifenilo, terfenilo, quaterfenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, antracenilo, dihidroantracenilo, benzatracenilo, dibenzatrancenilo, fenantrenilo, fluorenilo, pirenilo, idenilo, azulenilo, crisenilo, piridilo, 4-fenilpiridilo, 3-fenilpiridilo, tienilo, furilo, pirrolilo,

indolilo, piridazinilo, pirazolilo, pirazinilo, tiazolilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzofuranilo, benzotienilo, purinilo, quinazolinilo, fenazinilo, acridinilo, benoxazolilo, benzotluazolilo e outros semelhantes. Um grupo de hidrocarbonetos arilo inclui fenilo e naftilo. Os grupos arilo heterocíclicos incluem piridilo, tienilo, furilo, pirrolilo. Um grupo arilo pode estar opcionalmente substituído por um ou mais substituintes opcionais como aqui definido.

O termo "acilo" refere-se a um grupo $-C(O)-R$ em que R é um grupo alquilo, alcenilo, alquilo cílico, alquinilo, alcenilo cílico, alquinilo cílico, heteroarilo ou arilo. Os exemplos de acilo incluem alcanoílo de cadeia linear ou ramificada como acetilo, propanoílo, butanoílo, 2-metilpropanoílo, pentanoílo, 2,2-dimetilpropanoílo, hexanoílo, heptanoílo, octanoílo, nonanoílo, decanoílo, undecanoílo, dodecanoílo, tridecanoílo, tetradecanoílo, pentadecanoílo, hexadecanoílo, heptadecanoílo, octadecanoílo, nonadecanoílo e icosanoílo; cicloalquilcarbonilo, como ciclopripilcarbonilo ciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo e ciclo-hexilcarbonilo; aroílo como benzoílo, toluoílo e naftoílo; aralcanoílo como fenilalcanoílo (e.g. fenilacetilo, fenilpropanoílo, fenilbutanoílo, fenilisobutililo, fenilpentanoílo e fenil-hexanoílo) e naftilalcanoílo (e.g. naftilacetilo, naftilpropanoílo e naftilbutanoílo]. Uma vez que o grupo R pode estar opcionalmente substituído como acima descrito, "acilo" refere-se a acilo opcionalmente substituído.

Substituintes opcionais para alquilo, alcenilo, alquilo cílico, alquinilo, alcenilo cílico, alquinilo cílico, heteroarilo, arilo ou acilo incluem halo (bromo, flúor, cloro, iodo), hidroxilo, C₁-C₆ alquilo (e.g. metilo, etilo, propilo (isómeros *n*- e *i*-)), C₁-C₆ alcoxi (e.g. metoxi, etoxi, propoxi (isómeros *n*- e *i*-)), butoxi (isómeros *n*-, *sec*- e *t*-), nitro, amino, C₁-C₆ alquilamino (e.g. metil amino, etilamino, propilo (isómeros *n*- e *i*-amino)), C₁₋₆ dialquilamino (e.g., dimetilamino, dietilamino, diisopropilamino), halometilo (e.g., trifluorometilo, tribromometilo, triclorometilo), halometoxi (e.g., trifluorometoxi, tribromometoxi, triclorometoxi) e acetilo.

Um grupo alquilo, alcenilo, alquilo cílico, alquinilo, alcenilo cílico, ou alquinilo cílico pode também estar substituído (preferencialmente terminalmente) por um grupo arilo, ou um grupo alquilo cílico. Um grupo acilo pode estar substituído (por exemplo, substituído terminalmente) por um grupo arilo, heteroarilo ou um grupo alquilo cílico.

A formação glicosídica pode ser realizada quimicamente, e.g. fazendo reagir o composto de partida com um composto açúcar protegido em que C-1 foi activado por halogenação para acoplar com os grupos hidroxilo ou carboxilo e os hidroxilos açúcar foram bloqueados por grupos protectores. Em alternativa, a formação de glico-

sidos pode ser realizada enzimaticamente utilizando uma glicosiltransferase adequado como galactociltransferase dependente de UDP-galactose e glicociltransferase dependente de UDP-glucose (SIGMA).

Os sacarídeos ligados a C-1 preferidos são um substituinte sacarídeo furanose ou piranose (açúcar) que está ligado à estrutura principal apresentada na Fórmula (I) através do 1-carbono do sacarídeo (numeração química convencional) para formar uma ligação acetal em qualquer das posições R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ ou R₇ ou uma ligação éster na posição R₈ ou uma amida na posição R₉ ou R₁₀. Grupos sacarídeos exemplares incluem açúcares de redução como glucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose, cada um ligado a um átomo de oxigénio da estrutura de Fórmula (I) através do carbono C-1 do grupo sacarídeo.

O especialista na técnica reconhecerá que a fim de instalar selectivamente um ou mais do que um dos grupos derivados como aqui definido, pode ser necessário efectuar uma protecção e/ou desprotecção judiciosa, de um ou mais dos grupos oxi e/ou carboxilo do núcleo ciclobentenofurano. A derivatização selectiva de um ou mais grupos hidroxilo ou carboxilo pode ser conseguida através de técnicas convencionais pela utilização de grupos protectores com diferentes graus de estabilidade em condições apropriadas.

Os métodos para a conversão de um grupo ácido

carboxílico ou éster para uma amida são conhecidos pelo especialista na técnica e podem incluir o tratamento de um ácido carboxílico com uma amina apropriada na presença de um agente de acoplamento como DCC ou tratamento de um halogeneto ácido com a amina apropriada. Outros métodos que podem ser apropriados estão descritos em Larock, R. E., *Comprehensive Organic Transformations* pp.963-995, VCH Publishers (1989).

Tal como aqui utilizado, o termo "grupo protector", refere-se a uma funcionalidade introduzida que pode tornar temporariamente inativo determinado grupo funcional, e.g., hidroxilo ou ácido carboxílico, em determinadas condições em que o grupo poderia de outro modo ser reativo. Os grupos protectores adequados são conhecidos pelo especialista na técnica, por exemplo como descrito em *Protective Groups in Organic Synthesis* (*supra*). Os grupos protectores adequados para hidroxilo incluem os grupos alquilo, (como C₁-C₆ alquilo), acilo (como C(O)C₁-C₆ alquilo, benzoílo e outros semelhantes), benzilo e sililo (como trimetilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo e outros semelhantes). Outros grupos adequados para substituintes hidroxilos e um substituinte carboxilo (ácido, amida, etc.) podem ser encontrados em Greene *supra*. A estabilidade de vários grupos em determinadas condições pelo especialista na técnica está exemplificada em maior pormenor em *Protective Groups in Organic Synthesis* (*supra*).

Deverá ser também compreendido que o grupo dio-

xanilo de Fórmula (II), pode possuir centros assimétricos e por isso tem aptidão para existir numa ou mais do que uma forma estereoisomérica. A invenção assim relaciona-se ainda com compostos em forma isomérica substancialmente pura em um ou mais centros assimétricos (quirais) do grupo dioxanilo, *e.g.*, maiores do que cerca de 90% ee, como cerca de 95% ee, preferencialmente maior do que 99% ee, bem como as suas misturas, incluindo misturas racémicas. Estes isómeros podem ser resolvidos por métodos convencionais, *e.g.*, cromatografia, ou pela utilização de um agente de resolução.

Deverá também ser compreendido que os compostos ciclopentabenzofurano, com um substituinte metoxi ou hidroxilo, como os descritos nas referências aqui citadas *e.g.* Compostos de Referência 1-3 (como descrito no Exemplo 3) podem, quando apropriado, ser desmetilados, e o grupo hidroxilo resultante pode ser feito reagir com um precursor Y apropriado para formar um grupo OY. Os métodos para o fazer são conhecidos na técnica, por exemplo um método pode envolver fazer reagir o grupo OH com um composto Y-halogéneo em que halogéneo inclui Cl, Br e I.

Os compostos da invenção podem ser utilizados no fabrico de um medicamento para o tratamento de patologias cancerosas, ou outras patologias associadas com hiperproliferação celular num indivíduo. Os indivíduos que podem ser tratados pelos compostos da invenção incluem mamíferos, por exemplo, seres humanos, primatas, animais de

gado (e.g., ovelhas, vacas, cavalos, cabras, porcos), animais de companhia (e.g., cães, gatos, coelhos, porcos da índia), animais de testes laboratoriais, (e.g., ratos, ratinhos, porcos da índia, cães, coelhos, primatas) ou animais selvagens em cativeiro. Mais preferencialmente, os seres humanos são os indivíduos a serem tratados.

Tal como aqui utilizado, o termo "tratamento" inclui a prevenção, abrandamento, interrupção ou paragem do crescimento de um cancro, tumor ou célula hiperproliferativa, ou a redução no número de células alvo (ou tamanho da massa de crescimento), ou a destruição total da referida célula, em que as referidas células são células de cancro, tumor ou hiperproliferativas.

As patologias cancerosas que podem ser tratadas pelos compostos da presente invenção incluem patologias em que os cancros ou tumores podem ser simples (monoclonais, i.e., compostos por um único tipo de célula neoplásica), mistos (policlonais, i.e., compostos por mais de um tipo de célula neoplásica) ou compostos (i.e., compostos por mais de um tipo de célula neoplásica e derivados de mais de uma camada de germes) e podem incluir neoplasia/hiperplasia benigna e malinha. Alguns exemplos de patologias cancerosas que podem ser tratadas pela presente invenção incluem leucemia e cancro do cólon, útero, próstata, pulmão, ovários, cérebro, pele, fígado, intestino e estômago, tumores e melanomas. Exemplos de hiperplasias benignas incluem as de tecidos vasculares (e.g. hemangioma), pró-

tata, renal, adrenal, hepático, cólon, glândula paratiróide e outros tecidos.

Uma vez que os compostos podem ter propriedades citostáticas bem como propriedades citotóxicas, podem também potencialmente ser utilizados como agentes terapêuticos na supressão do crescimento de populações alvo de células que não sejam células de cancro ou tumor, por exemplo, em estados patológicos ou patologias associadas com hiperproliferação celular. Estas patologias podem incluir ateroscleroze e restinose (hiperplasia neointima) e hiperproliferação devida ou que acompanha uma resposta inflamatória, e.g., artrite (incluindo artrite reumatóide, osteoartrite e artrite inflamatória), psoriase e doença periodontal, ou hiperproliferação celular devida à infecção viral de células como vírus do papiloma humano.

Os compostos da invenção podem estar combinados com outros compostos terapêuticos, como compostos anticancerosos, incluindo paclitaxel, camptotecina, vinblastina e doxorubicina.

Assim, outro aspecto da invenção está relacionado com a utilização de um composto de Fórmula (I) na manufatura de um medicamento para tratar cancro ou patologias cancerosas para utilização em conjunção com outros agentes terapêuticos.

Os compostos da invenção e os outros agentes

terapêuticos podem ser administrados simultaneamente, como uma composição única ou como composições individuais, ou podem ser administrados separadamente, i.e., um após o outro em intervalos adequados como determinado pelo médico assistente.

Tal como aqui utilizado, o termo "quantidade eficaz" de um composto está relacionado com uma quantidade de composto que, quando é administrada de acordo com o regime de dosagem desejado, proporciona a actividade terapêutica desejada. A administração pode ocorrer em intervalos de minutos, horas, dias, semanas, meses ou anos ou continuamente durante qualquer um desses períodos. As dosagens adequadas estão na gama de cerca de 0,1 ng em peso de peso corporal a 1 g por kg de peso corporal por dosagem. A dosagem está preferencialmente na gama de 1 µg a 1 g em peso corporal por dosagem, como na gama de 1 mg até 1 g por kg em peso corporal por dosagem. Noutra forma de realização, a dosagem está na gama de 1 mg a 250 mg por kg em peso corporal por dosagem. Em ainda outra forma de realização, a dosagem está na gama de 1 µg a 100 mg por kg em peso corporal por dosagem, como até 50 mg por kg de peso corporal por dosagem. O regime de dosagem para cada indivíduo pode depender da idade, peso, saúde e história médica do indivíduo e da extensão e progresso da patologia a ser tratada, e pode ser determinado pelo médico assistente.

O agente activo pode ser administrado numa dose

única ou numa série de doses. Apesar de ser possível que o agente activo seja administrado só, é preferível que esteja presente como uma composição, preferencialmente como uma composição farmacêutica.

O veículo tem de ser farmaceuticamente aceitável no sentido que tem de ser compatível com os outros agentes da composição e não pode ser nocivo para o sujeito. As composições incluem composições adequadas para administração oral, rectal, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). As composições podem estar convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer método bem conhecido na técnica farmacêutica. Estes métodos incluem o passo de criar associação do agente activo com o veículo que constitui um ou mais agentes acessórios. Em geral, as composições são preparadas pela criação de uma associação uniforme e íntima entre os agentes activos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e em seguida, se necessário, moldar o produto.

As composições da presente invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades individuais como cápsulas, saquetas ou comprimidos, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada do agente activo; como pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso; ou como uma emulsão líquida óleo em água ou emulsão líquida água em

óleo. O agente activo pode também ser apresentado como um "bólus", eletuário ou pasta.

Um comprimido pode ser formado por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais agentes acessórios. Os comprimidos comprimidos podem ser preparados pela compressão do agente activo em forma de fluxo livre como pó ou grânulos numa máquina adequada, opcionalmente misturado com um aglutinante (e.g., diluente inerte, conservante desintegrante como glicolato de amido sódico, polivinil pirrolidona de ligação cruzada, carboximetilcelulose sódica de ligação cruzada), agente activo à superfície ou agente de dispersão. Os comprimidos moldados podem ser preparados por moldagem numa máquina adequada de uma mistura do composto em pó humidificado com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem opcionalmente estar revestidos ou ranhurados e podem ser formulados de forma a proporcionar libertação lenta ou controlada do agente activo que contém utilizando, por exemplo, hidroxipropilmetylcelulose em diferentes proporções para proporcionar o perfil de libertação desejado. Os comprimidos podem opcionalmente ser proporcionados com revestimento entérico, para proporcionar a libertação em partes do aparelho digestivo que não seja o estômago.

As composições adequadas para administração tópica na boca incluem pastilhas que compreendem o agente activo numa base com aroma, geralmente sacarose e acácia ou goma tragacanto; pastilhas que compreendem o agente activo

numa base inerte como gelatina e glicerina, ou sacarose e goma acácia; e lavagens bucais compreendendo o agente activo num veículo líquido adequado.

As composições para administração rectal podem estar apresentadas como um supositório com uma base adequada que compreende, por exemplo, manteiga de cacau, gelatina, polietileno glicol.

As composições adequadas para administração vaginal podem estar apresentadas como pessários, tampões, cremes, geles, pastas, espumas ou formulações em sprays que contêm, além do agente activo, veículos que são conhecidos na técnica como sendo apropriados.

As composições adequadas para administração parentérica incluem soluções aquosas e não-aquosas isotónicas estéreis para injecção, que podem conter anti-oxidantes, tampões, bactericidas e solutos que tornam a composição isotónica com o sangue do receptor; e suspensões aquosas e não-aquosas estéreis que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As composições podem estar apresentadas em recipientes selados de dose unitária ou multi dose, por exemplo, ampolas e frascos, e podem ser armazenadas em estado liofilizado, requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo água para injecções, imediatamente antes da utilização. Soluções para injecção extemporâneas e suspensões podem ser preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo anteriormente descrito.

As composições de dosagem unitária são as que contêm uma dosagem ou unidade diária, sub-dose diária, como aqui acima descrito, ou uma fracção apropriada do agente activo.

Deverá ser compreendido que além dos agentes activos especificamente referidos acima, as composições desta invenção podem incluir outros agentes convencionais na técnica em relação ao tipo de composição em questão, por exemplo, os adequados para administração oral podem incluir outros agentes adicionais como aglutinantes, edulcorantes, espessantes, agentes aromatizantes, agentes desintegrantes, agentes de revestimento, conservantes, lubrificantes e/ou agentes de retardamento temporal. Agentes edulcorantes adequados incluem sacarose, lactose, glucose, aspartame ou sacarina. Os agentes desintegrantes adequados incluem amido de milho, metilcelulose, polivinilpirrolidona, goma de xantano, bentonite, ácido algínico ou ágar. Os agentes aromatizantes adequados incluem óleo de hortelã-pimenta, cereja, laranja ou framboesa. Os agentes de revestimento adequados incluem polímeros ou co-polímeros de ácido acrílico e/ou metaacrílico e/ou os seus ésteres, ceras, álcoois gordos, shelac ou glúten. Os conservantes adequados incluem benzoato de sódio, vitamina E, alfa-tocopherol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno ou bissulfito de sódio. Os lubrificantes adequados podem incluir estearato de magnésio, ácido esteárico, oleato de sódio, cloreto de sódio ou talco. Os agentes retardadores

de tempo podem incluir monoestearato de glicerilo ou distearato de glicerilo.

Uma ou mais formas de realização da presente invenção pode também proporcionar agentes de composição ou compostos que têm uma vantagem (ou evitam uma desvantagem) associada com os métodos, composições, agentes ou compostos conhecidos utilizados no tratamento quimioterapêutico de patologias cancerosas ou patologias associadas com a hiperproliferação das células. Estas vantagens podem incluir um ou mais de: actividade terapêutica aumentada, efeitos secundários reduzidos, citotoxicidade reduzida para células não-cancerosas ou não-proliferativas, solubilidade ou dispersibilidade melhorada para formulação em composições farmacêuticas, estabilidade melhorada ou um meio mais prontamente disponível para obter os referidos compostos, e.g., através de processos sintéticos ou de isolamento mais simples, mais baratos, ou com rendimento mais elevado.

Os especialistas na técnica compreenderão que a invenção aqui descrita pode sofrer variações e modificações diferentes daquelas especificamente descritas. Deverá ser compreendido que a invenção inclui todas essas variações e modificações que estão dentro do âmbito das reivindicações.

A invenção será agora descrita com referência aos Exemplos seguintes que estão incluídos com o propósito de ilustrar as formas de realização da invenção e não devem

ser considerados como limitadores do que foi aqui antes descrito de forma geral.

EXEMPLOSExemplo 1Isolamento dos Compostos A e B a partir de Aglia leptantha

Os Compostos A e B foram isolados utilizando o procedimento seguinte:

- (a) Tratar uma amostra de tronco moído da espécie de árvore *Aglaia leptantha* com metanol.
- (b) Filtrar o extracto e concentrar a solução resultante em vácuo.
- (c) Fraccionar o extracto através de extracção de fase sólida numa coluna de extracção Varian C-18 (10 g) utilizando ácido fórmico a 0,1% em acetonitrilo/água com concentrações cada vez mais elevadas de acetonitrilo.
- (d) Recolher o eluato obtido com acetonitrilo/água numa razão de 7:20. Os Compostos A e B têm uma absorção UV máxima de 200, 273 nm (acetonitrilo/água/ácido fórmico a 0,1%) e tempos de retenção HPLC de aproximadamente 30,67 (Composto A) e 31,05 minutos (Composto B) nas condições

seguintes: Coluna C-8 Symmetry (WATERS), 4,6 x 250 mm, 5 µm 1 mL/min, gradiente linear desde 0% a 90% de acetonitrilo em água durante 40 minutos com ácido fórmico a 0,1%.

(e) Concentrar a fracção obtida no passo (d).

(f) Cromatografar o concentrado obtido no passo (e) numa coluna preparativa C-8 (WATERS, Nova-Pak C-18, 6 micron, 2,5 x 25 cm) num caudal de 20 mL/min utilizando um gradiente linear desde 25% a 45% de acetonitrilo em água em 30 minutos com ácido fórmico a 0,1%.

(g) Recolher e concentrar os eluatos com as características cromatográficas e espectroscópicas esquematizadas no passo (d) a aproximadamente 22 minutos.

(h) Cromatografar cada eluato obtido em (g) numa coluna Sephadex LH20 utilizando metanol como solvente. Recolher e concentrar as fracções com as características espectrais esquematizadas em (d).

(i) Em alternativa aos passos (b), (c) e (d), os extractos de metanol obtidos em (a) podem ser partilhados com volumes iguais de água e diclorometano. A fase diclorometano é então processada de acordo com os passos (e) a (h).

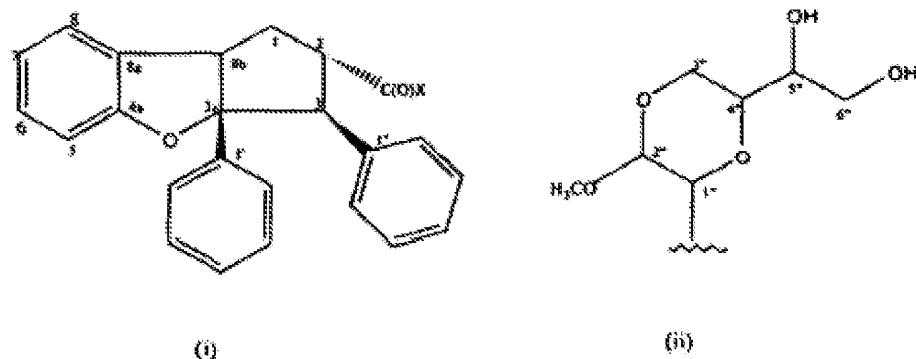
Os compostos assim obtidos têm as características espectroscópicas e físicas seguintes:

Absorção máxima UV/Vis: 223, 275nm (em MeCN/H₂O, 0,1% HCOOH).

MS: Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa Finnigan LCQ de trapa iónica utilizando a fonte ESI no modo de ião positivo. A amostra foi dissolvida em 0,1% de FA em MeOH e introduzida na fonte por perfusão com uma bomba de seringa a uma taxa de 3 µL/min. Para os Compostos A, observaram-se sinais a m/z 677 [M+Na⁺]⁺; MS² rendeu m/z 659 [M+NaH₂O]⁺; MS³ rendeu m/z 627 (perda de 32 amu); MS⁴ rendeu m/z 595 (perda de mais 32 amu) e m/z 451 (perda de 176 amu, equivalente à cadeia lateral de dioxano). Para o Composto B observaram-se sinais no modo de ião positivo a m/z 677,2 [M+Na+]⁺; MS² rendeu iões filhos a m/z 627,2 e m/z 659,2. Mais fragmentação do sinal a m/z 627,2 deu um ião filho a m/z 595,3.

Espectros de massa nítidos para o Composto A foram obtidos no Espectrómetro de Massa Bruker 47e Fourier Transform - Ion Ciclotron Resonance (FTMS) equipado com uma fonte de electropulverizador Analytica (ESI). A amostra foi dissolvida em MeOH e introduzida na fonte por perfusão directa com uma bomba de seringa a uma taxa de 60 µL/min. A fonte foi operada com voltagem capilar de 100v. Observou-se um sinal foi observado a m/z 677,2194 [M+Na]⁺ meas.; C₃₄H₃₈O₁₃Na⁺ requer 677.2204.

O espectros NMR dos Compostos A e B foram adquiridos em espectrômetros Varian INOVA de 400 e 500 MHz, em CD_3OD e CDCl_3 , respectivamente. Foram conduzidos os ensaios seguintes: ^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC, COSY. Os desvios químicos ^1H NMR (obtidos em CDCl_3) e os desvios químicos ^{13}C NMR estão enumerados na Tabela 1.

**Tabela 1**

Posição	Valor	Composto A		Composto B	
		^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)
1	CH	5,03, d, 6,7 Hz. 1H	79,6	5,04, d, 6,8 Hz, 1H	79,6
2	CH	3,89, dd, 14,2, 6,7 Hz, 1H	50,03	3,9, dd, 14, 6,8 Hz, 1H	50
	COOCH ₃		170,6		170,7
	COOCH ₃	3,65, s, 3H	52,06	3,66, s, 3H	52
3	CH	4,28, d, 14,2 Hz, 1H	55,03	4,28, d, 14 Hz, 1H	55
3a	C		101,9		101,8
4a	C		160,6		160,2
5	CH	6,43, d, 2 Hz, 1H	92,8	6,45, d, 2 Hz, 1H	92,8
	C		157,1		157,1
	OCH ₃	3,87, s, 3H	55,9	3,86, s, 3H	55,8
7	CH	6,28 d, 2 Hz, 1H	93,9	6,29 d, 2 Hz, 1H	94,3
	C		160		159,8
8a	C		109,6		109,4

(continuação)

8b	C	93,4	
1'	C	126,2	126,2
2', 6'	2xCH	7,10, br d, 9 Hz, 2H	128,9 7,10, br d, 9 Hz, 2H
3', 5'	2xCH	6,68, br d, 9 Hz, 2H	112,7 6,69, br d, 9 Hz, 2H
4'	C	158,8	158,8
	OCH ₃	3,71, s, 3H	55,05 3,72, s, 3H
1''	C	136,7	136,6
2'', 6''	2xCH	6,84, m, 2H	127,8 6,86, m, 2H
3'', 5''	2xCH	7,06, m, 2H	127,8 7,06, m, 2H
4''	CH	7,06, m, 1H	126,6 7,06, m, 1H
1'''	CH	5,28, s, 1H	94 5,26, s, 1H
2'''	CH	4,59, s, 1H	95,2 4,60, s, 1H
	OCH ₃	3,49, s, 3H	55,1 3,5, s, 3H
		4,13, t, 11,2 Hz, 1H	4,02, t, 11,2 Hz, 1H
3'''	CH ₂	3,56, dd, 11,7, 2 Hz, 1H	59 3,78, dd, 11,7, 2,4 Hz, 1H 59,6
4'''	CH	4,23, br t, 11,3 Hz, 1H	68,3 4,12, ddd, 11, 6,8, 2,8 Hz 67,6
5'''	CH	3,61, m, 1H	70,6 3,66, m, 1H
6'''	CH ₂	3,61, m, 2H	63,3 3,61, dd, 10,4, 4,4 Hz, 1H 62,5

Exemplo 2

Os Compostos A e B são citostáticos e citotóxicos para linhas celulares de tumor humano

Os compostos A e B foram identificados a partir de uma amostra de tronco de *Aglaia leptantha* pela sua aptidão para inibir a produção de Factor-a de necrose tumoral humano (TNF- α) por células de leucemia promonocíticas THP-1 humanas (Tsuchiya, et al., *Int. J. Cancer*, 1980, 26 (2): 171-6) activadas com lipopolisacarídeo (LPS). A Tabela 2 sumaria os resultados comparando a actividade dos Compostos A e B em relação à inibição de TNF- α , com os seus efeitos no metabolismo celular geral medido utilizando redução WST-1, síntese de ADN e ensaios de síntese de

proteína para células THP-1. Os Compostos A e B inibiram potenteamente a produção de TNF- α em concentrações aproximadamente semelhantes que estavam activas na redução de WST-1, ensaios de síntese de ADN e proteína. Para comparação, os efeitos dos Compostos A e B em células de carcinoma epitelial do pulmão A459 (*Leiber et al., Int. J. Cancer*, 1976, 17(1): 62-70) foram também medidos e os dados estão incluídos na Tabela 2. Os Compostos A e B são significativamente menos potentes para a inibição da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (IL-1) induzida por interleucina (ICAM-1) por células A549 apesar de nestas células a inibição da síntese de proteína e ADN ocorrer em concentrações aproximadamente semelhantes ao que acontece para as células THP-1.

Tabela 2: Comparação dos efeitos dos Compostos A e B em células THP-1 e A549

O Composto A purificado ou o Composto B solubilizado em DMSO foram testados numa gama de concentrações em paralelo em relação à actividade inibidora nos vários ensaios tanto em células THP-1 como em células A549. As concentrações que resultaram em 50% de inibição da resposta relevante (IC₅₀) estão apresentadas. A produção de TNF- α por células THP-1 foi medida como a quantidade libertada no sobrenadante da cultura durante 18 horas por ensaio imunoadsorvente em enzima conjugada (ELISA) utilizando os anticorpos monoclonais anti-TNF α de ratinho (anticorpo de captura, MAB610; anticorpo de detecção,

MAB210 biotinilado; ambos de R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). A expressão de ICAM-1 por células A549 à superfície foi testada após 24 horas de cultura por ligação de anticorpo directa utilizando um anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 de ratinho rotulado com europio (R & D Systems Cat. No. BBA3) e medido por fluorescência resolvida por tempo utilizando ensaio Delfia (EG & G Wallac, Turku, Finlândia). A redução de WST-1 (Roche, Cat. No. 1644807) por células THP-1 foi medida após 18 horas de cultura de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de proteína foi medida como a incorporação de [¹⁴C]-leucina (0,5 µCi/mL) após 48 horas para as células THP-1 e 72 horas para as células A549 cultivadas em meio de crescimento (RPMI-1640, 10% FBS) contendo 10% da concentração de L-leucina usual (5 mg/mL). A síntese de ADN foi medida como a incorporação de [¹⁴C]-timidina (0,5 µCi/mL) após 48 horas para as células THP-1 e 72 horas para as células A549 em meio de crescimento normal.

Composto	<i>IC₅₀</i> (µM)						
	Células THP-1				Células A549		
	Produção de TNF- <i>a</i>	Redução de WST-1	Síntese de proteína	Síntese de ADN	Produção de ICAM-1	Síntese de Proteína	Síntese de ADN
Composto A	0,06	0,03	0,06	0,015	2	0,02	0,007
Composto B	0,015	0,04	0,003	0,003	5	0,01	0,004

O Composto A foi avaliado quanto à actividade citotóxica e citostática contra um painel de linhas celulares derivadas de uma variedade de tipos de tumores humanos além das células THP-1 e A549 (Tabela 3). Estas

incluíam células de leucemia K562 (Lozzio e Lozzio, 1975, *Blood* 45: 321-34), células tumorais da próstata PC3 (Kaighn et al., 1979, *Invest. Urol.* 17: 16-23) e células glioblastoma SF268 (Westphal et al., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132: 284-9). O Composto A apresentou potente actividade citostática em quase todas as linhas celulares testadas com valores de GI₅₀ entre 1-7 nM. O Composto A também apresentou potentes efeitos citotóxicos contra as várias linhas celulares tumorais. É interessante que as células THP-1 e PC3 mostraram que foram mais rapidamente mortas com pouca diferença nos valores de LC₅₀ obtidos após 3 ou 6 dias de cultura. Porém, a potência citotóxica do Composto A aumentou drasticamente após 6 dias de cultura para as células K562, A549 e SF268. Deverá ser notado que a concentração do Composto A necessária para inibir a proliferação celular foi significativamente mais baixa do que as concentrações necessárias para provocar uma resposta citotóxica. Assim, o efeito citostático do Composto A é bioquimicamente distingível da sua capacidade para induzir a morte celular. A Tabela 4 mostra que o Composto B apresentou efeitos citotóxicos contra as várias linhas celulares tumorais com potência comparável à observada com o Composto A.

Tabela 3: O Composto A tem potente actividade citostática e citotóxica em várias linhas celulares tumorais humanas *in vitro*.

O Composto A purificado foi testado numa gama de

concentrações até um máximo de 1×60^{-6} M (1000 nM) quanto a actividade citostática e citotóxica contra um painel de linhas celulares derivadas de vários tipos de tumores humanos como indicado. O valor GI_{50} representa a concentração do composto que inibiu o aumento do número de células (relativamente a células não tratadas) em 50% após 3 dias de cultura. O número relativo de células foi determinado por medição do ADN celular utilizando um corante de ligação a ADN fluorescente (YOYO-1) depois de lisar as células com digitonina (Becker et al., *Anal Biochem*, 1994, 221 (1): 78-84). O valor LC_{50} representa a concentração do composto que matou 50% das células. A morte celular foi medida com a proporção de células mortas que apresentavam teor de ADN sub-diplóide determinada por citometria de fluxo após coragem com iodeto de propídio (Nicoletti et al., *J. Immunol. Methods*, 1991, 139: 271-79).

Fonte do tumor	Linha celular do tumor	Composto A		
		<i>GI₅₀ (nM) (cultura de 3 dias)</i> <i>(culturas de 3 dias)</i>	<i>LC₅₀</i> <i>(nM)</i>	<i>LC₅₀ (nM) (culturas de 6 dias)</i>
<i>Leucemia</i>	<i>THP-1</i>	—	36	24
	<i>K562</i>	1	>1000	10
<i>Pulmão</i>	<i>A549</i>	7	914	21
<i>Próstata</i>	<i>PC3</i>	5	18	12
<i>Cérebro</i>	<i>SF268</i>	3	461	29

Tabela 4: Os Compostos A e B apresentam uma actividade citotóxica semelhante

A Actividade citotóxica dos Compostos A e B foi

comparada para as várias linhas celulares tumoriais como descrito na Tabela 3.

<i>Fonte do tumor</i>	<i>Linha celular do tumor</i>	<i>LC₅₀ (nM) (cultura de 6 dias)</i>	
		<i>Composto A</i>	<i>Composto B</i>
<i>Leucemia</i>	<i>THP-1</i>	11	15
	<i>K562</i>	12	12
<i>Pulmão</i>	<i>A549</i>	15	12
<i>Próstata</i>	<i>PC3</i>	12	12
<i>Cérebro</i>	<i>SF268</i>	12	22

Exemplo 3

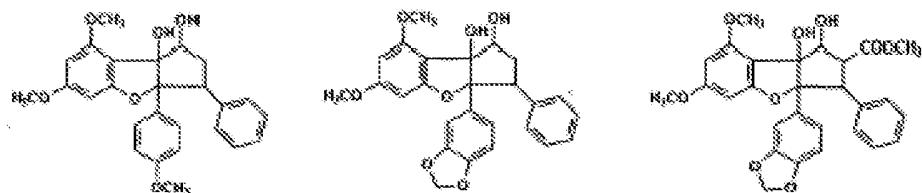
A actividade citotóxica do Composto A não é partilhada por outros compostos relacionados conhecidos sem a nova substituição dioxaniloxi.

A Tabela 5 compara os efeitos citostáticos e citotóxicos do Composto A para os três linhanos 1-H-ciclopenta[b]benzofurano que não têm o novo grupo dioxaniloxi. Os compostos de referência são: Rocaglaol (Composto de Referência 1) (Ohse *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 1996, 57 (7): 650-52); 4'-Demetoxi-3',4'-metilenodioxirocaglaol (Composto de Referência 2); 4'-demetoxi-3',4'-metilenodioxirocaglato (Composto de Referência 3) (Lee *et al.*, *Chem Biol. Inter.*, 1998, 115 (3): 215-28). Os quatro compostos apresentaram actividade citostática detectável em células A549 sendo o Composto A o mais potente seguido, por ordem decrescente, pelos Compostos de

Referência 3, 2 e 1, respectivamente. É importante que nos compostos testados que não o Composto A nenhum dos Compostos de Referência apresentou qualquer citotoxicidade apreciável nas células THP-1 ou A549 em doses até 5000 nM durante o ensaio de 3 dias. Sem pretender limitar a invenção pela teoria, sugere-se que a nova substituição de dioxaniloxi é importante para a actividade citotóxica apresentada pelo Composto A e distingue-o de outros linhanos 1H-ciclopenta[b]benzofuranos anteriormente identificados.

Tabela 5: Linhanos relacionados com 1H-ciclopenta[b]benzofuranos sem a nova cadeia lateral dioxaniloxi não apresentam actividade citotóxica.

Células A549 e THP-1 foram tratadas com concentrações cada vez maiores dos vários compostos até um máximo de 5×10^{-6} (5000 nM) e os efeitos na proliferação e viabilidade celular foram determinados após 3 dias de cultura. Os valores Gi_{50} foram determinados pela medição das alterações relativas no número celular utilizando YOYO-1 como descrito para a Tabela 3. Os valores de C_{50} foram determinados pela medição da morte celular como uma função de perda da integridade da membrana utilizando incorporação YOYO-1 (Becker *et al.*) *Anal. Biochem.*, 1994, 221 (1): 78-84). As estruturas dos compostos de referência estão também apresentadas.



<i>Composto de Referência 1</i>	<i>Composto de Referência 2</i>		<i>Composto de Referência 3</i>
<i>Composto</i>	<i>Células A549</i>		<i>Células THP-1</i>
	<i>GL₅₀ (nM)</i>	<i>LC₅₀ (nM)</i>	<i>LC₅₀ (nM)</i>
<i>Composto A</i>	13	514	15
<i>Composto de Referência 1</i>	3980	>5000	>5000
<i>Composto de Referência 2</i>	389	>5000	>5000
<i>Composto de Referência 3</i>	56	>5000	>5000

Exemplo 4

O Composto A tem actividade aguda para inibir a síntese de proteína

O Composto A foi também examinado para determinar se podia inibir rapidamente a biossíntese geral da proteína. Utilizando incorporação de [¹⁴C]leucina em material celular insolúvel como um ensaio para a biossíntese geral da proteína, a Tabela 6 mostra que o Composto A teve um efeito inibidor evidente passado 3 horas após a adição a células TPIP-1 com um IC₅₀ de ~30 nM. A síntese de ADN medida durante o mesmo tempo também foi inibida, mas com menor potência (IC₅₀ ~ 70 nM) e pode ser secundária à inibição da síntese de proteína. Ciclo-hexamida, um conhecido inibidor da síntese de proteína (Obrig et al., 1971, *J. Biol. Chem.* 246 (1), 174-181), também inibiu a síntese de proteína e de

ADN sendo o Composto A significativamente mais potente do que ciclo-hexamida nos seus efeitos. A Tabela 6 mostra que o Composto A também inibiu a síntese geral de proteína em células A549 com um IC_{50} de ~30 nM que é semelhante ao observado nas células THP-1.

Tabela 6: O Composto A inibe a biossíntese geral de proteína

Células THP-1 e células A549 foram pré-tratadas com as concentrações indicadas do Composto A durante 1 hora antes da adição de (1 μ Ci/mL) [^{14}C]leucina (síntese de proteína) ou [^{14}C]timidina (síntese de ADN) durante mais 2 horas. Os valores de IC_{50} representam a concentração do composto A requerida para inibir a incorporação do isótopo em 50% em relação às culturas de controlo não tratadas.

Composto	IC_{50} (nM)		
	Células THP 1		Células A549
	Síntese de proteína	Síntese de ADN	Síntese de proteína
Composto A	27	72	32
Ciclo-hexamida	263	303	238

Exemplo 5

O Composto A induz a diferenciação de linhas celulares de leucemia humana

Nos ensaios com as células de leucemia monocitica THP-1, que normalmente crescem livres em suspensão,

constatámos que a exposição prolongada das células a 10 nM do Composto A resultava na acumulação de células que aderia a plástico e apresentavam numerosa pseudopodia (Figura 1). Esta é uma morfologia altamente característica de macrófagos maduros e efeitos morfológicos semelhantes foram observados quando as células foram tratadas com outros indutores de diferenciação macrófaga conhecidos incluindo interferão- γ (IFNy) ou forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Para investigar mais efeitos adicionais do Composto A examinaram-se células de leucemia promielocíticas humanas HL60 (Collins, et al., *Nature*, 1977, 270: 347-9) (Tabela 7). Esta linha celular amplamente utilizada está bem caracterizada com um modelo de diferenciação mielomonocítica humana (Collins, *Blood*, 1987, 70 (5): 1233-44). Neste ensaio a diferenciação monocítica foi quantificada pela medição da expressão do抗原 de superfície CD14 por análise de citometria de caudal. CD14, uma proteína que liga a LPS, está expressa na superfície das células de linhagem mielomonocíticas e está normalmente expressa em níveis muito baixos em células HL60 não diferenciadas (Ferrero et al., *Blood*, 1983, 61(1): 171-9). Consistente com os dados THP-1 acima, a Tabela 7 mostra que o Composto A em doses maiores do que 10 nM aumentou significativamente a expressão de CD14 nas células HL60 viáveis que permaneciam após 4 dias de cultura. Tomados conjuntamente, estes dados indicam fortemente que o Composto A tem aptidão para induzir diferenciação de linhas celulares de células de leucemia humanas.

Tabela 7: O Composto A promove diferenciação monocítica de células de leucemia HL60.

Células HL60 foram cultivadas durante 4 dias com a concentração indicada do Composto A e em seguida foram colhidas e fixas em etanol a 70%. As células foram então coradas com anticorpo CD14 monoclonal anti ratinho (OKM1) e isto foi medido utilizando IgGI cabra anti-ratinho FITC-conjugado como anticorpo secundário. As células coradas foram visualizadas por citometria de fluxo e a análise foi restringida às células consideradas viáveis no momento da fixação com base nas suas características de difusão de luz frontal e lateral. A coragem não específica das células foi controlada pela incubação apenas com anticorpo secundário.

<i>Concentração do Composto A (nM)</i>	<i>% de células que expressam CD14</i>
0	1,3%
5	3,3%
10	5,7%
25	46,0%
50	43,0%

Exemplo 6

A actividade citostática do Composto A está associada a uma inibição geral da progressão do ciclo celular em células A549

A análise do teor de ADN de células THP-1 trata-

das com diferentes concentrações do Composto A (Figura 2) demonstrou que a 10 nM eram apenas fracamente citotóxicas (a acumulação aumentada de células mortas desde 7% a 17%) e nestas condições levaram as células a acumular-se nas fases G0/G1 do ciclo celular. Isto indica que o Composto A tem também actividade citostática em células THP-1. Para comparação, a Figura 2 mostra que o microtúbulo destabilizador fármaco paclitaxel (Sorger *et al.*, *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9 (6): 807-14) que também induziu a morte de células THP-1, causou acumulação de células nas fase G2/M do ciclo celular.

O efeito citostático do Composto A na proliferação das células A549 foi confirmado por contagem directa do número de células em intervalos durante um período de 9 dias (Figura 3). Quando comparado com células não tratadas 10 nM do Composto A evitou o aumento do número de células em mais de 95% com menos 10% de células mortas observadas nesta altura (medida por exclusão de azul de tripano). Assim, nestas condições o número diminuído de células não pode ser apenas devido ao aumento de morte de células. Uma inibição significativa do número de células foi verificada num espaço de 2 dias indicando que o Composto A actua de uma forma rápida. Nas concentrações mais elevadas de 50 nM e 250 nM o Composto A teve efeitos citotóxicos e aumentou a morte celular para 86% e 100% respectivamente após 9 dias e é responsável pelo declínio do número de células para níveis abaixo do número de partida original neste momento. À concentração não-

citotóxica de 10 nM, o Composto A tem o efeito citostático rápido e potente nas células A549. Para ajudar a identificar um potencial mecanismo para os efeitos do Composto A, a análise de teor de ADN foi realizada para determinar onde no ciclo celular exercia o seu efeito (Figura 4). A análise do ciclo celular de células A549 tratadas com o Composto A durante 6 dias mostrou que a 10 nM, em que não era evidente qualquer toxicidade, houve um declínio menor da proporção de células nas fases G0/G1 do ciclo celular com um aumento concomitante nas células nas fases G2/M.

Tomado conjuntamente com os dados da curva de crescimento na Figura 3 acima, estes dados indicam que 10 nM do Composto A resulta num alongamento de todas as fases do ciclo celular com talvez um alongamento ligeiramente mais prolongado das fases G2/M. Isto contrasta com os efeitos de paclitaxel, um fármaco conhecido por actuar selectivamente nas fases G2/M do ciclo celular (Figura 4). Uma vez que a concentração do Composto A foi aumentada e os seus efeitos citotóxicos se tornaram evidentes, a proporção de células nas fases S e G2/M decresceram com um correspondente aumento de células nas fases G0/G1. Apesar de haver pouca diferença no número de células mortas entre 50 nM e 250 nM a dose mais elevada resultou numa maior acumulação de células nas fases G0/G1 do ciclo celular. Assim, em comparação com as células THP-1 (ver Figura 2), são necessárias concentrações mais elevadas do Composto A para inibir o progresso através das fases G0/G1 do ciclo celular em células A549.

Células de leucemia K562 tratadas com 10-15 nM de Compostos A ou B apresentaram uma característica acumulação de células nas fases G2/M do ciclo celular (Figura 5). Isto ocorreu ao longo de uma estreita gama de concentrações uma vez que os Compostos A ou B a menos de 5-8 nM ou a mais de 25 nM não causaram uma acumulação na fase G2/M. Estes dados indicam que diferentes linhas celulares podem variar em termos de sensibilidade e respostas aos Compostos A e B para efeitos específicos de fases de ciclos celulares.

Exemplo 7

O efeito citostático do Composto A é reversível em células A549

A reversibilidade dos efeitos do Composto A foi determinada. Para isto, células A549 permaneceram não tratadas ou foram cultivadas na presença de várias concentrações do Composto A ou com paclitaxel durante 5 dias antes da remoção dos compostos e as células foram cultivadas durante mais 4 dias antes de se determinar o número de células (Figura 6). 10 nM de Composto A supriu significativamente o número de células aumentado durante até 9 dias sem citotoxicidade significativa. No entanto, para estas culturas, quando o Composto A foi removido após 5 dias, houve um aumento de cinco vezes do número celular durante os 4 dias de cultura subsequentes, representando duplicação 2-3 da população. Os efeitos dos tratamentos que

foram nocivos para as células, como concentrações mais elevadas do Composto A ou a presença de paclitaxed, não foram invertidos após a sua remoção.

Exemplo 8

O Composto A inibe a citotoxicidade dependente do ciclo celular provocada por vários agentes anti-cancro

Para examinar em maior profundidade os efeitos do Composto no ciclo celular uma concentração citostática deste composto foi combinada com outros agentes anti-cancro conhecidos por actuarem em pontos específicos do ciclo celular para averiguar se o Composto A tinha aptidão para perturbar os seus efeitos dependentes do ciclo celular.

A viabilidade das células foi ensaiada após 3 dias através da medição da exclusão do corante de ligação a ADN fluorescente YOYO-1. (Becker *et al.*, *Anal Biochem*, 1994, 221(1): 78-84). Células A549 foram tratada com uma dose 10 nM não citotóxica do Composto A na presença de concentrações cada vez mais elevadas de camptotecina e paclitaxel. Camptotecina é um inibidor de ADN topoisomerase 1, uma enzima necessária para a replicação de ADN, e resulta na perturbação da fase S do ciclo celular com morte celular subsequente devida à fase S do ciclo celular com morte celular subsequente devida à activação de um ponto de verificação de fase S (Darzynkiewicz *et al.*, *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 803: 93-100). Paclitaxel, como já foi

anteriormente referido, inibe a função de microtúbulo requerida para a formação de haste mitótica resultando assim na activação de um ponto de verificação de fase M e subsequente morte celular (*Sorger et al., Curr Opin Cell Biol, 1997 9 (6):807-14*). A Figura 7 mostra que 10 nM de Composto A reduziu significativamente os efeitos citotóxicos de camptotecina e paclitaxel mesmo quando estes fármacos foram adicionados até um excesso de 2000 vezes. O Composto A pode, de uma forma dominante, evitar os efeitos citotóxicos dependentes do ciclo celular de camptotecina e paclitaxel.

Isto foi examinado em maior pormenor utilizando análise de teor de ADN para medir especificamente a progressão do ciclo celular e morte celular. Neste ensaio além de camptotecina e de paclitaxel as células foram também tratadas com vinblastina (outro inibidor de microtúbulo) (*Sorger et al., 1997, supra*) e estaurosporina (um inibidor de quinase) (*Gescher, Crit Rev Oncol Hematol., 2000, 34 (2): 127-35*). Como anteriormente verificado, as células A549 tratadas com 10 nM do Composto A mostraram um menor decréscimo de células em G0/G1 com um ligeiro aumento de células na fase G2/M sem aumento detectável de morte celular durante os três dias de cultura (Figura 8). Consistente com o seu conhecido mecanismo de acção, camptotecina resultou na acumulação de células na fase S do ciclo celular e também aumentou o nível de células mortas detectadas como sendo aquelas com um teor de ADN sub-diploide. Também como esperado, tanto vinblastina como

pacilitqzel resultaram na maioria das células pararem nas fases G2/M do ciclo celular e aumento do aparecimento de células mortas sub-diploides. No entanto, para todos estes agentes, a presença de 10 nM de Composto A evitou a sua paragem do ciclo celular característica e inibiu significativamente os seus efeitos citotóxicos, reduzindo dramaticamente o surgimento de células mortas sub-diploides. Em contraste, o Composto A teve pouco efeito nos efeitos citotóxicos de estaurosporina, um agente que parece ter aptidão para matar células em todas as fases activas do ciclo celular.

Exemplo 9

Efeitos citostáticos do Composto A não se correlacionam com um biomarcador para senescência de replicação

A taxa de crescimento dramaticamente reduzida das células A549 cultivadas na presença de 10 nM de Composto A (ver Figura 3) levou à consideração da possibilidade de que este composto estava a induzir senescência de replicação destas células tumorais imortais. Consistente com esta possibilidade, nestas condições as células A%49 com uma morfologia altamente sugestiva de um fenótipo senescente foram frequentemente observadas, estando altamente achatadas com uma área de superfície alargada em relação com a sua aparência habitual (comparar por exemplo os subpainéis a e b das Figuras 9). Isto foi avaliado em maior

pormenor através da medição da actividade de β -galactosidase (SA-gal) associada com senescência, um biomarcador anteriormente descrito para correlacionar bem com a senescência de células humanas (Dimri *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92 (20): 9363-7). Recentemente verificou-se que alguns agentes anti-cancerosos que actuam por mecanismos diversos, incluindo doxorubicina, cisplatina, citarabina, etoposide e paclitaxel, têm todos aptidão para induzir actividade SA-p-gal em várias linhas celulares tumorais (Chang *et al.*, *Cancer Res* 1999, 59 (15): 3761-7). Assim, para além do composto A, as células A549 foram também tratadas com doxorubicina como controlo experimental. Este fármaco actua pela estabilização de complexos de ADN/topoisomerase II causando assim danos ao ADN que resultam em paragem subsequente do ciclo celular fase S e/ou morte celular (Froelich-Ammon e Osheroff, 1995, *J. Biol. Chem.* 270 (37): 21429-21432). A Figura 9 mostra que, consistentemente com o relatório anterior, as células A549 tratadas com 250 nM de doxurubícina mostravam o fenótipo chato alargando de células senescentes e apresentavam actividade SA-(3-gal). Em contraste, o Composto A em várias doses desde 10-50 nM não conseguiu induzir actividade de SA-p-gal apesar das células apresentarem a morfologia achata e alargada. Assim, em contraste com vários outros fármacos anti-cancro os efeitos citostáticos do Composto A não se correlacionam com este marcador específico de senescência celular.

Exemplo 10

O Composto A inibe a proliferação celular mas não aumenta o tamanho celular.

É bem sabido que a proliferação e crescimento celular reflectido como uma massa aumentada de células individuais são processos bioquimicamente separáveis (Pardee, *Science*, 1989, 246: 603-8). Apesar de, a determinadas concentrações, o Composto A ter aptidão para inibir a proliferação celular sem citotoxicidade patente, avaliou-se também se o Composto A também afectava o crescimento celular. Para estes ensaios, células A549 foram tratadas com várias doses não-citotóxicas de Composto A até 10 nM e o tamanho relativo das células foi determinado após 6 dias de cultura pela medição da difusão de luz frontal utilizando um citómetro de fluxo. Os dados descritos na Tabela 8 mostram que na presença do Composto A as células A549 apresentaram um aumento na difusão frontal média de mais de 20%. Isto ocorreu apenas em concentrações que são citostáticas para este tipo de célula.

Tabela 8: O Composto A aumenta o tamanho celular

Células A549 cultivadas durante 6 dias com várias concentrações não-citotóxicas do Composto A como indicado foram examinadas por citometria de fluxo para avaliar as suas características de difusão luminosa frontal que se relaciona directamente com o tamanho celular. A % de

aumento do volume médio das células representa a alteração relativa no valor médio de difusão frontal para as populações tratadas versus as populações não tratadas.

<i>Concentração do Composto A (nM)</i>	<i>% de aumento do volume médio das células</i>
0	-
2,5	10,4%
5,0	10,7%
10,0	22,4%

Exemplo 11

O Composto A inibe o crescimento de linhas celulares de células tumorais humanas num modelo de tumor de xenoenxerto de ratinho

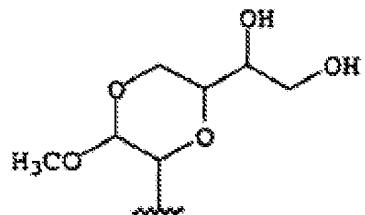
A aptidão do Composto A para inibir o crescimento de células tumorais humanas *in vivo* foi avaliado utilizando ratinhos machos atímicos injectados subcutaneamente na região do flanco dorsal com 2 x 10⁶ células tumorais da próstata humanas PC3. A administração do Composto A (3 mg/kg) por injecção intraperitoneal começou após oito dias quando o tumor PC3 era palpável e continuou três vezes por semana até 29 dias após a inoculação inicial de células tumorais. Nesta altura os ratinhos foram mortos e os tumores foram excisados e pesados. A Figura 10A mostra que em comparação com os animais de controlo tratados com veículo só os ratinhos tratados com o Composto A mostravam um aumento grandemente reduzido do volume médio dos tumores

durante o decurso do ensaio. Isto foi confirmado no final do ensaio quando os tumores foram excisados e pesados e verificou-se que o tratamento com Composto A reduziu o peso médio dos tumores em cerca de 60% (Figura 10B). O peso corporal não foi afectado com os grupos de controlo e os grupos tratados a apresentar uma redução semelhante de ~12% em peso corporal médio durante o decurso do ensaio. Assim, o composto A apresenta actividade anti-tumoral *in vivo*.

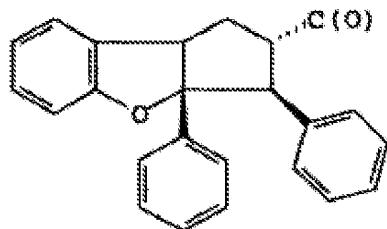
Lisboa, 21 de Dezembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de ciclopentabenzofurano que compreende um grupo de fórmula (ii)



ligado, através de um átomo de oxigénio, a um núcleo ciclopentabenzofurano de fórmula (i)



com as características de espectro NMR seguintes:

¹H NMR (CDCl₃) (ppm)

3,49, s, 3H; 3,56, dd, 11,7, 2Hz, 1H; 3,61, m, 1H,
 3,61, 2H; 3,65, s, 3H; 3,71, s, 3H; 3,87, s, 3H; 3,89, dd,
 14,2, 6,7 Hz, 1H; 4,13, t, 11, 2Hz, 1H; 4,23, brt, 11,3 Hz,
 1H; 4,28, d, 14,2 Hz, 1H; 4,59, s, 1H; 5,03, d, 6,7 Hz,

1Hz; 5,28, s, 1H; 6,28, d, 2Hz, 1H; 6,43, d, 2Hz, 1H; 6,68, brd, 9Hz, 2H; 6,84,m, 2H; 7,06, m, 2H, 7,06, m, 1H; 7,10, brd, 9Hz, 2H;

¹³C NMR (CDCl₃) (ppm)

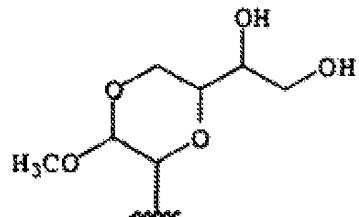
50,03, 52,06, 55,03, 55,05, 55,1, 55,9, 59, 63,3, 68,3, 70,6, 79,6, 92,8, 93,4, 93,9, 94, 95,2, 101,9, 109,6, 112,7, 126,2, 126,6, 127,8, 127,8, 128,9, 136,7, 157,1, 158,8, 160, 160,6, 170,6;

ou um seu sal, derivado ou pro-fármaco, em que o pro-fármaco ou derivado é um éster, glicosido, alquiloxi opcionalmente substituído, alcoxi cílico opcionalmente substituído, alceniloxi opcionalmente substituído, alceniloxi cílico opcionalmente substituído, alquiniloxi opcionalmente substituído, alquiniloxi cílico opcionalmente substituído, aciloxi de fórmula -O-C(O)-R opcionalmente substituído, em que R é um grupo alquilo, alquilo cílico, alcenilo, alcenilo cílico, alquinilo, alquinilo cílico, heteroarilo ou arilo, ou opcionalmente ariloxi opcionalmente substituído ou heteroariloxi opcionalmente substituído;

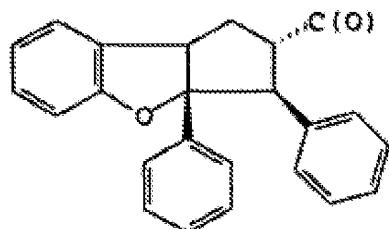
e os substituintes opcionais para o referido alquiloxi opcionalmente substituído, alcoxi cílico opcionalmente substituído, alceniloxi opcionalmente substituído, alceniloxi cílico opcionalmente substituído, alquiniloxi opcionalmente substituído, alquiniloxi cílico opcional-

mente substituído e aciloxi opcionalmente substituído são seleccionados de um ou mais de halogeno, hidroxilo, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi, nitro, amino, C₁₋₆ alquilamino, C₁₋₆ dialquilamino, halometilo, halometoxi, acetilo, arilo, heteroarilo ou um grupo alquilo cílico e os substituintes opcionais para os referidos ariloxi substituído e heteroariloxi substituído são seleccionados de um ou mais de halogeno, hidroxilo, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi, nitro, amino, C₁₋₆ alquilamino, C₁₋₆ dialquilamino, halometilo, halometoxi ou acetilo.

2. Composto ciclopentabenzofurano compreendendo um grupo de fórmula (ii)



ligado, através de um átomo de oxigénio a um núcleo de ciclopentabenzofurano de fórmula (i)



e com as características de espectro NMR seguintes:

¹H NMR (CDCl₃) (ppm)

3,5, s, 3H; 3,61, dd, 10,4, 4,4Hz, 1H; 3,66, m, 1H;
3,66, s, 3H; 3,72,m; 3,72, s, 3H; 3,78, dd, 11,7, 2,4 Hz,
1H; 3,86, s, 3H; 3,9, dd, 14, 6,8Hz, 1H; 4,02, t, 11,2 Hz,
1H; 4,12, ddd, 11, 6,8, 2-8Hz, 1H; 4,28, d, 14Hz, 1H; 4,60,
S, 1H; 5,04, d, 6,8Hz, 1H ; 5,26, S, 1H; 6,29, d, 2Hz, 1H;
6,45, d, 2Hz, 1H; 6,69, brd, 9Hz, 2H; 6,86, m, 2H; 7,06,m,
2H; 7,06, m, 1H; 7,10, brd, 9Hz, 2H;

¹³C NMR (CDCl₃) (ppm)

50, 52, 55, 55, 55, 55, 55, 8, 59, 6, 62, 5, 67, 6, 71, 4,
79, 6, 92, 8, 93, 4, 94, 3, 95, 2, 101, 8, 109, 4, 112, 8, 126, 2,
126, 6, 127, 5, 127, 5, 128, 9, 136, 6, 157, 1, 158, 8, 159, 8,
160, 2, 170, 7.

ou um seu sal, derivado ou pro-fármaco, em que o pro-fármaco ou derivado é um éster, glicosido, alquiloxi opcionalmente substituído, alcoxi cílico opcionalmente substituído, alceniloxi opcionalmente substituído, alcenilo cílico opcionalmente substituído, alquiniloxi opcionalmente substituído, alquiniloxi cílico opcionalmente substituído, aciloxi de fórmula -O-C(O)-R opcionalmente substituído, em que R é um grupo alquilo, alquilo cílico, alcenilo, alcenilo cílico, alquinilo, alquinilo cílico, heteroarilo ou arilo, ou opcionalmente ariloxi opcionalmente substituído ou heteroariloxi opcionalmente substituído;

e os substituintes opcionais para o referido alquiloxi opcionalmente substituído, alcoxi cíclico opcionalmente substituído, alceniloxi opcionalmente substituído, alceniloxi cíclico opcionalmente substituído, alquiniloxi opcionalmente substituído, alquiniloxi cíclico opcionalmente substituído e aciloxi opcionalmente substituído são seleccionados de um ou mais de halogeno, hidroxilo, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi, nitro, amino, C₁₋₆ alquilamino, C₁₋₆ dialquilamino, halometilo, halometoxi, acetilo, arilo, heteroarilo ou um grupo alquilo cíclico e os substituintes opcionais para os referidos ariloxi substituído e heteroariloxi substituído são seleccionados de um ou mais de halogeno, hidroxilo, C₁₋₆ alquilo, C₁₋₆ alcoxi, nitro, amino, C₁₋₆ alquilamino, C₁₋₆ dialquilamino, halometilo, halometoxi ou acetilo.

3. Composição que compreende um composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, conjuntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável; excipiente ou diluente.

4. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, no fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro ou de uma patologia cancerosa.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4 em que o cancro ou patologia cancerosa é seleccionado de leucemia, cancro da mama, cólon, útero, próstata, cérebro,

pulmão, ovário, pele, fígado e intestino e estômago, tumores e melanomas.

6. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2 no fabrico de um medicamento para o tratamento de um estado patológico associado com hiperproliferação celular.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 6 em que o estado patológico ou patologia é aterosclerose, restinose, artrite reumatóide, osteoartrite, artrite inflamatória, psoriase, doença periodontal, ou hiperproliferação celular induzida viralmente.

8. Um composto que é obtido por:

(a) tratar uma amostra de tronco moído da espécie de árvore *Aglaia leptantha* com metanol;

(b) filtrar o extracto resultante e concentrar a solução resultante em vácuo;

(c) fraccionar o extracto resultante através de extracção de fase sólida numa coluna de extracção Varian C-18 (10 g) utilizando ácido fórmico a 0,1% em acetona/nitrilo/água com concentrações cada vez mais elevadas de acetonitrilo.

(d) recolher o eluato obtido com acetonitrilo/água numa razão de 7:20;

(e) concentrar a fracção obtida no passo (d).

(f) cromatografar o concentrado obtido no passo (e) numa coluna preparativa C-18 (num caudal de 20 mL/min utilizando um gradiente linear desde 25% a 45% de acetonitrilo em água em 30 minutos com ácido fórmico a 0,1%;

(g) recolher e concentrar os eluatos com absorção máxima UV a 200 e 273 nm e tempos de retenção HPLC de aproximadamente 30,67 e 31,05 minutos;

(h) cromatografar cada eluato obtido em (g) numa coluna Sephadex LH20 utilizando metanol como solvente; recolher e concentrar as fracções com as características espetrais esquematizadas em (g).

Fig. 1

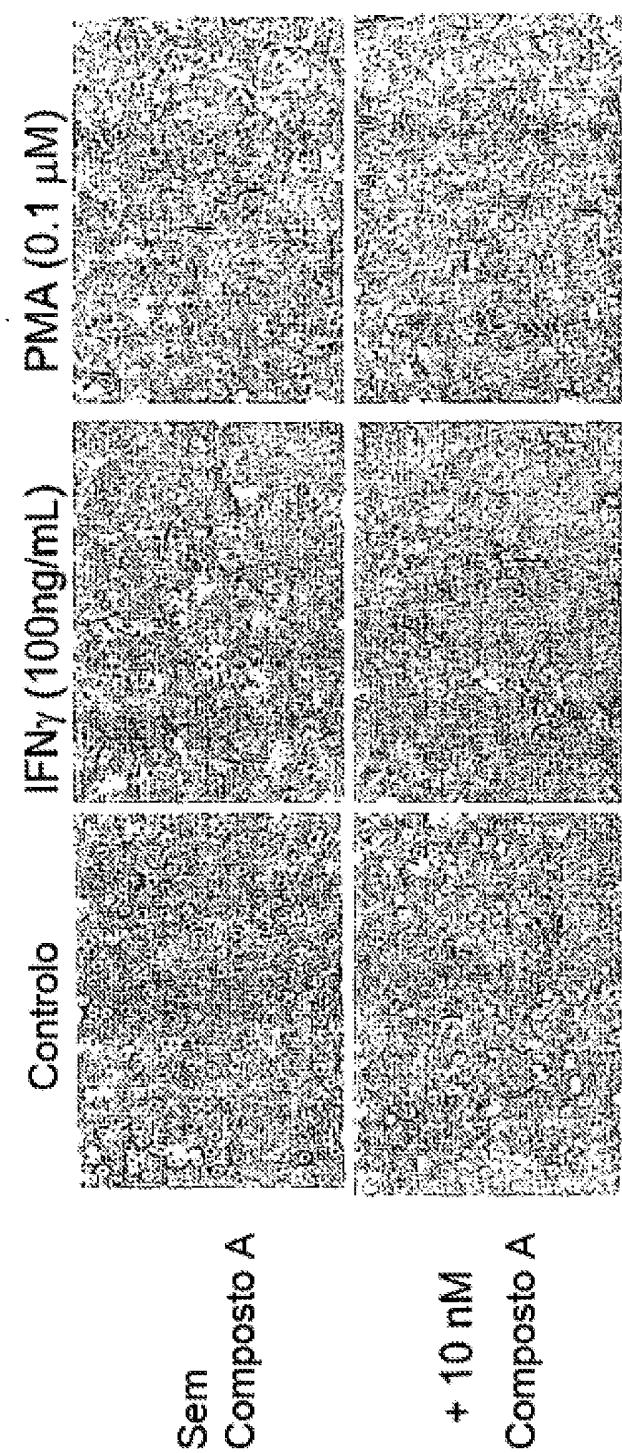


Figura 2

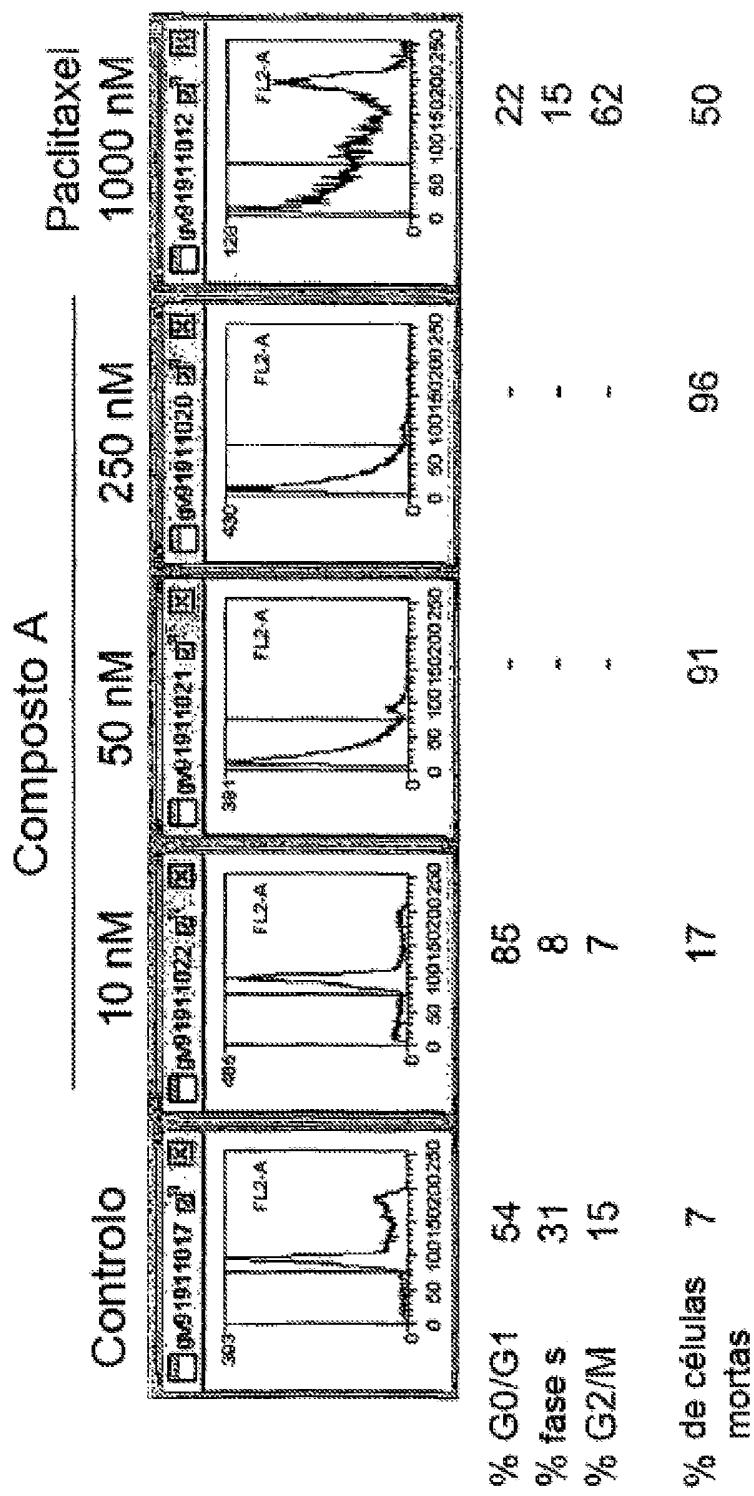


Figura 3

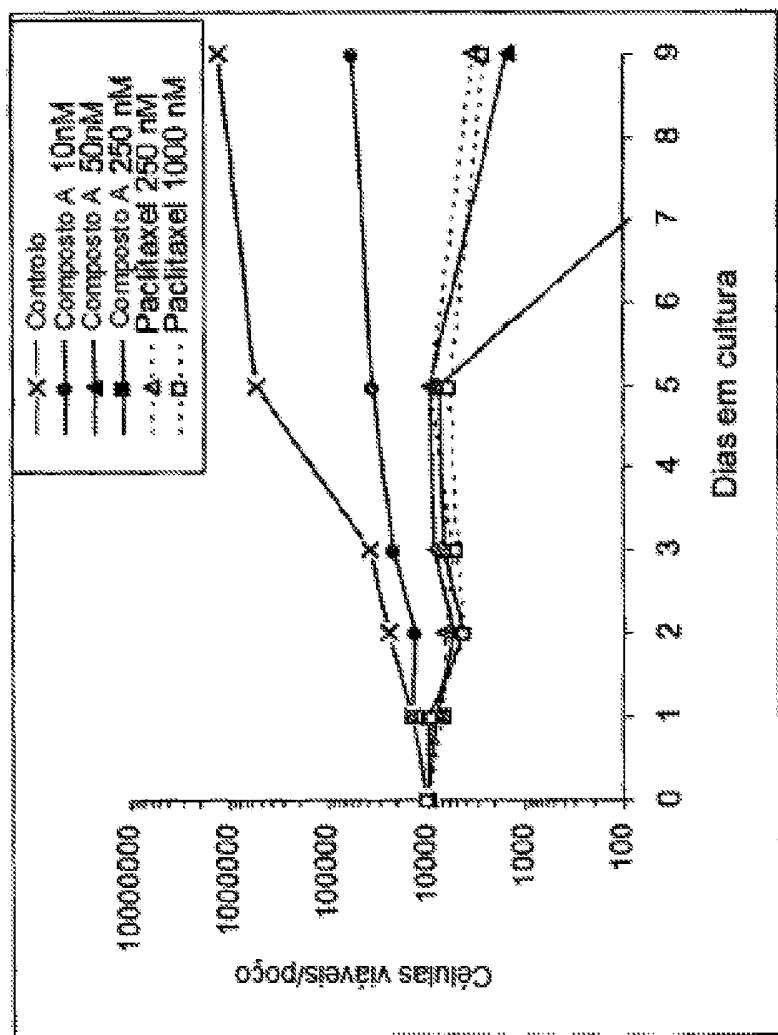


Figura 4

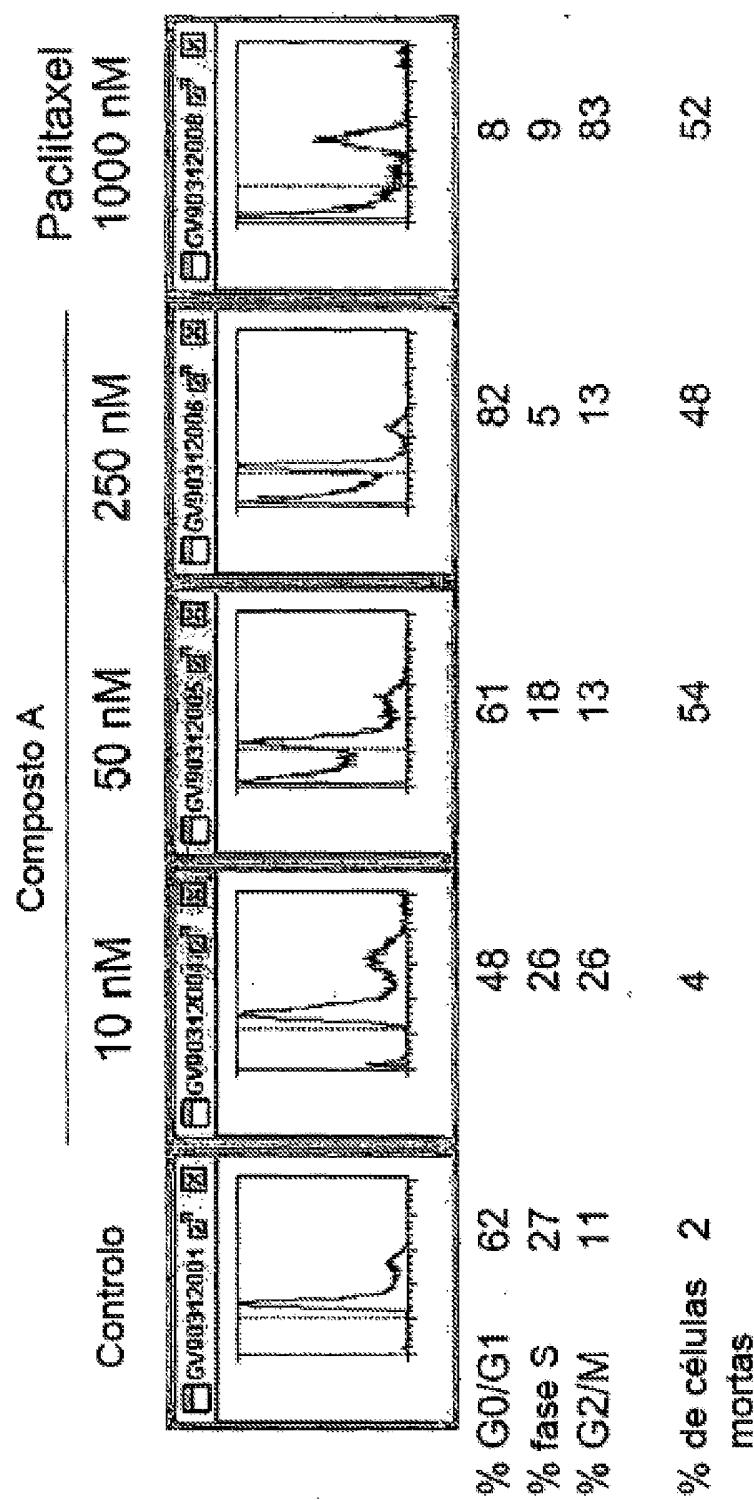


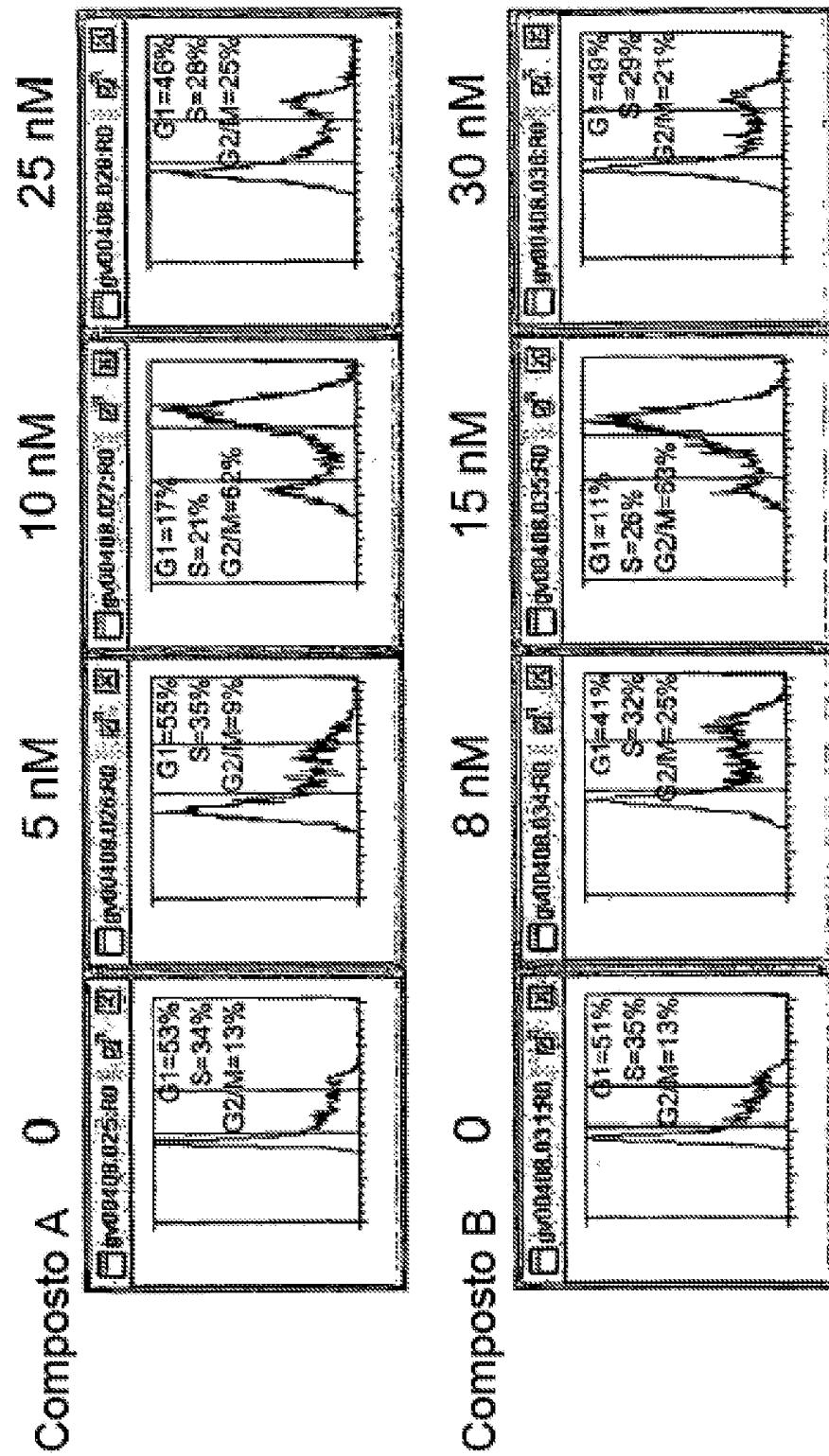
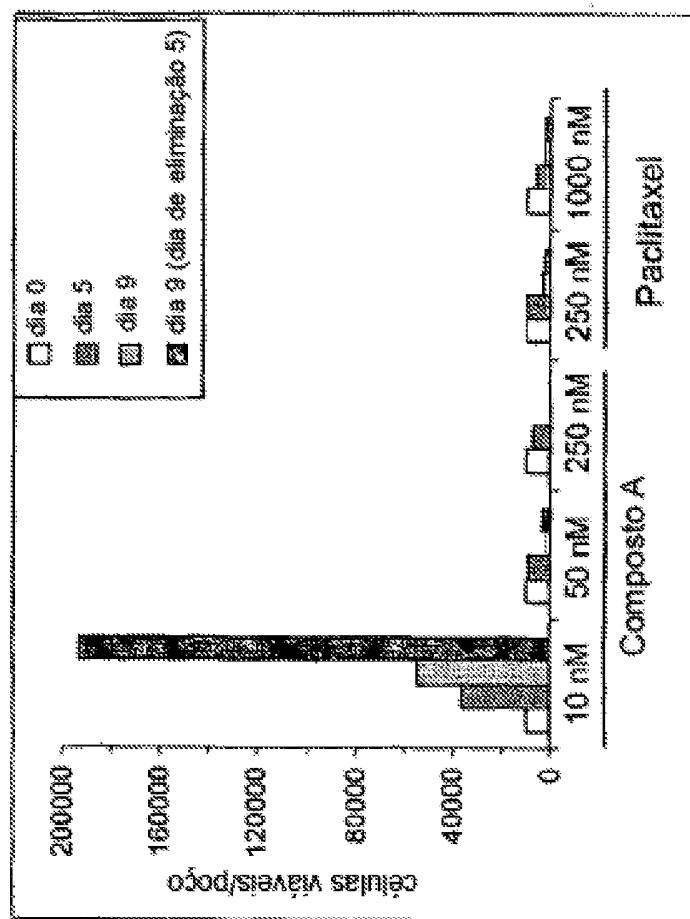
Figura 5

Figura 6

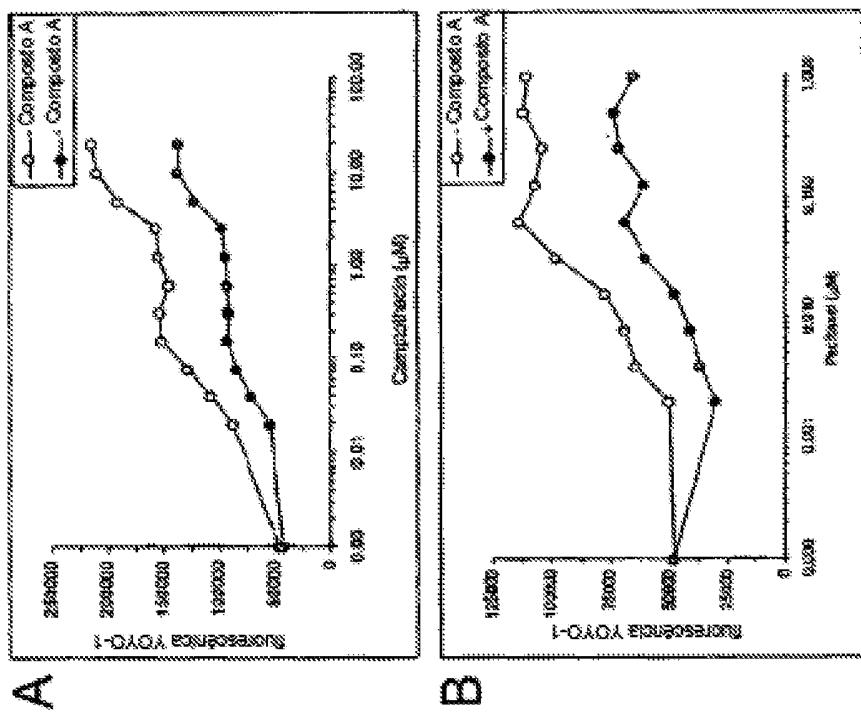


Figura 8

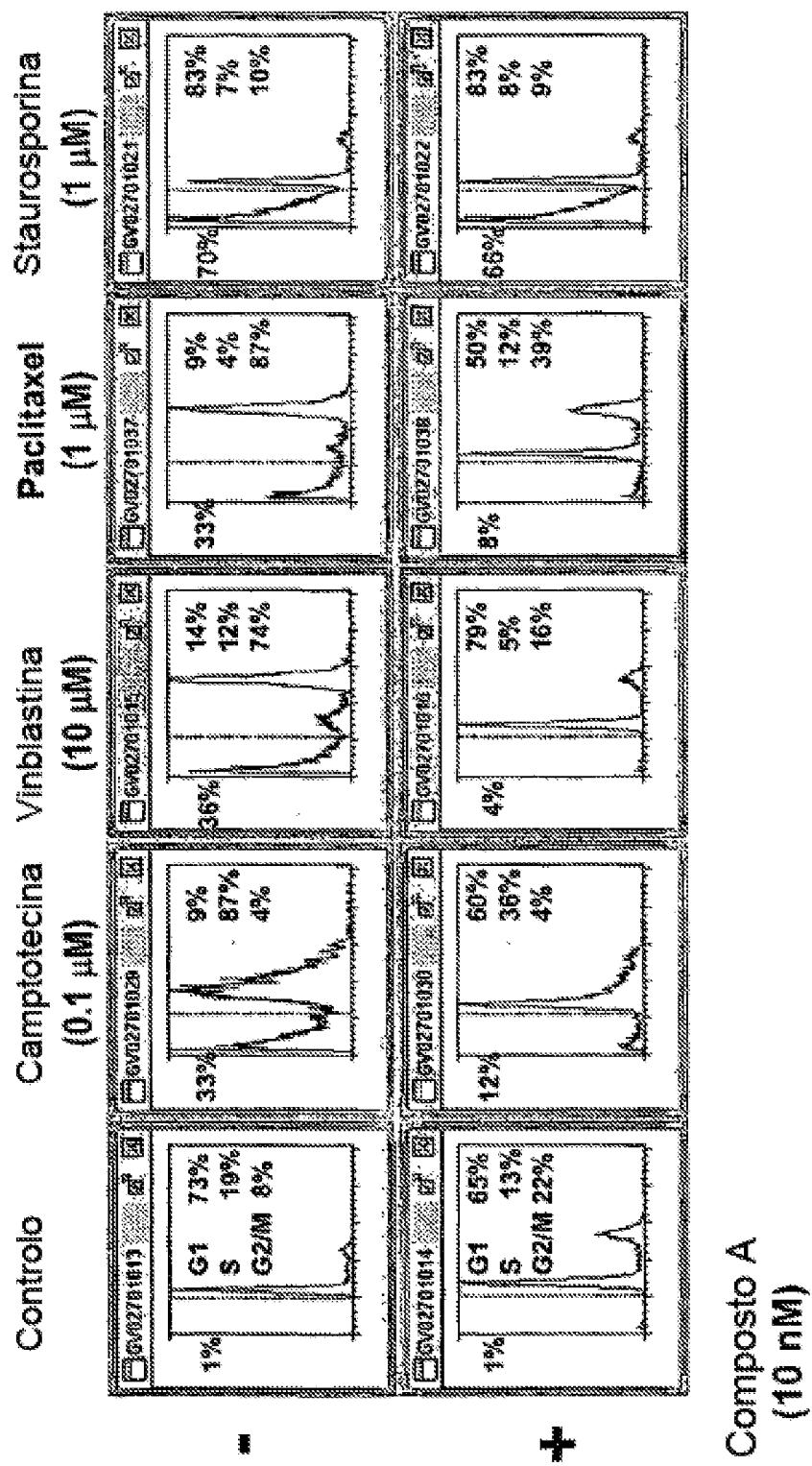


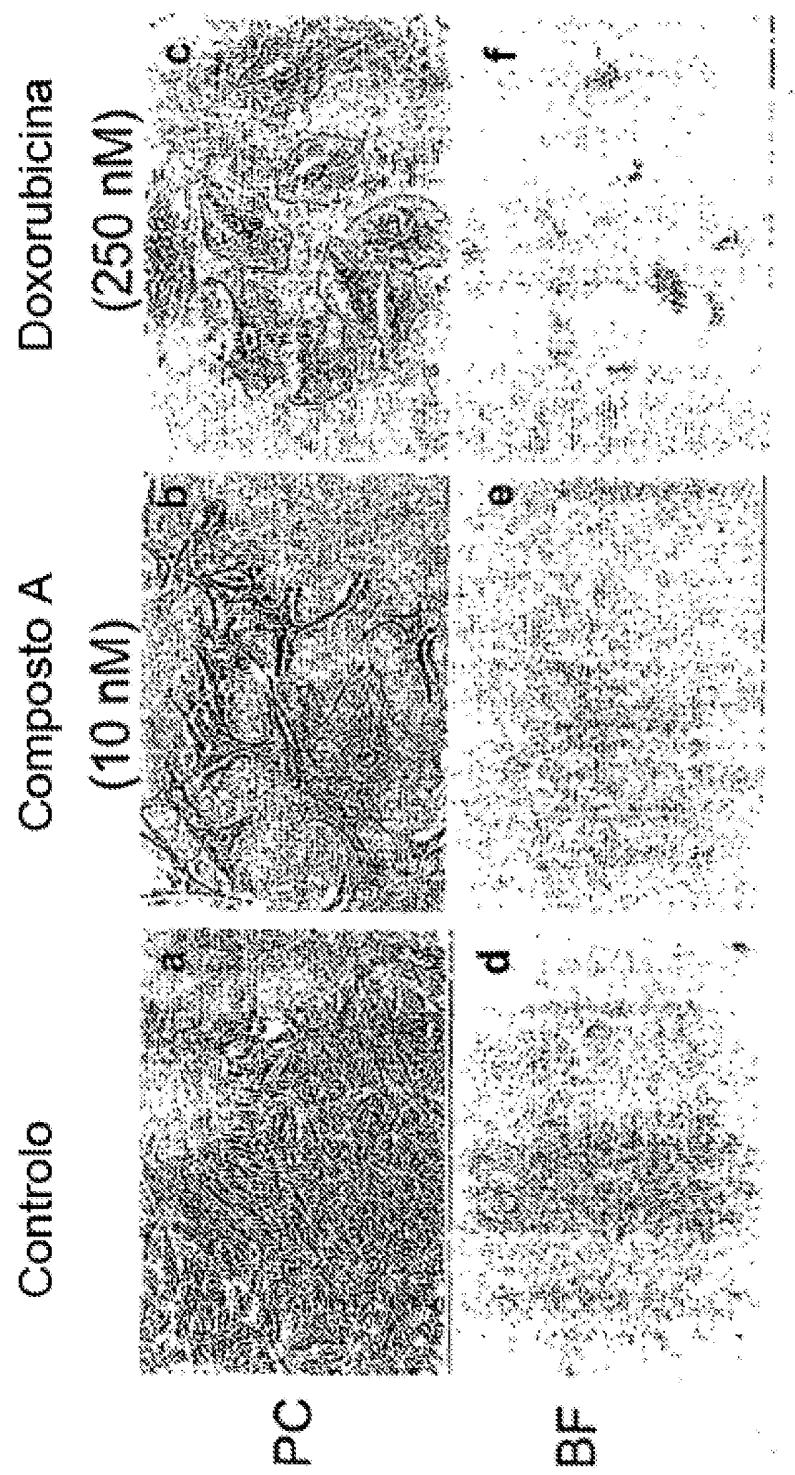
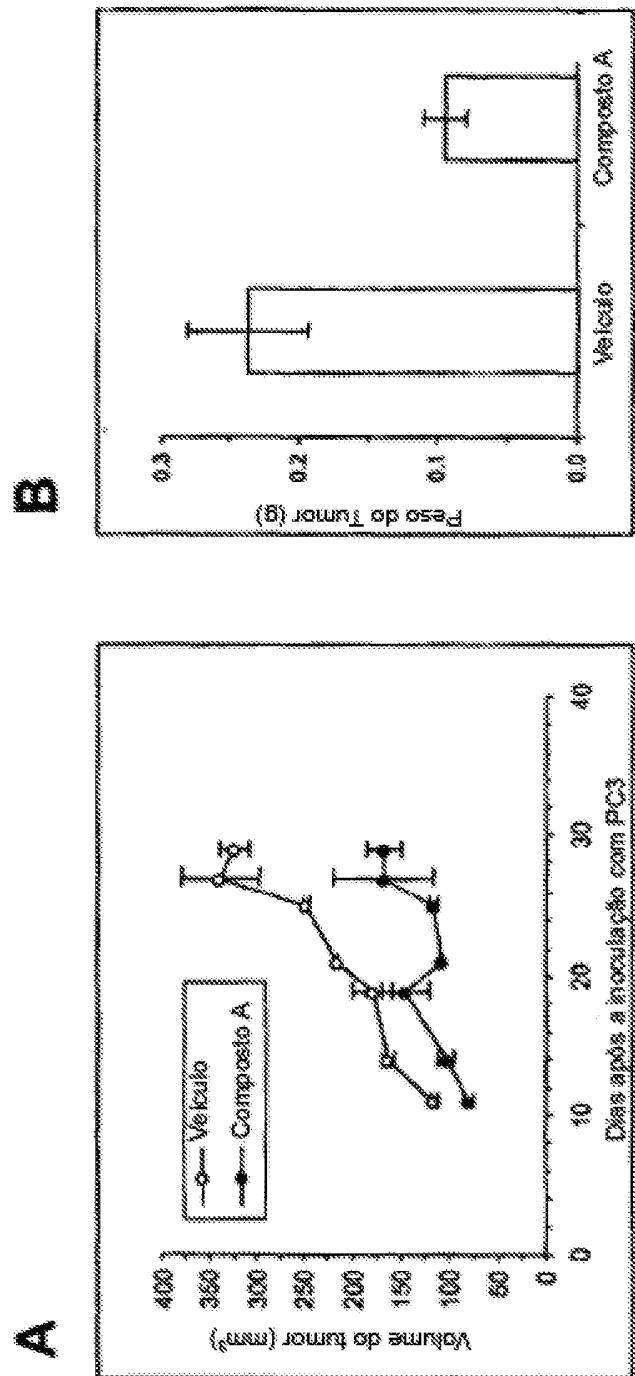
Figura 9

Figura 10

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 9708161 A
- * JP 97171356 B
- * WO 9604284 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * PANNEL et al. *Kew Bull.*, 1992, vol. 16, 273-283
- * OHSE et al. *J Nat Prod.*, 1996, vol. 59 (7), 650-52
- * LEE et al. *Chem. Biol. Interact.*, 1998, vol. 115 (3), 215-28
- * WU et al. *J. Nat. Prod.*, 1997, vol. 60 (6), 806-08
- * BOHNENSTENGEL et al. *Z. Naturforsch.*, 1999, vol. 54c (12), 55-60
- * BOHNENSTENGEL et al. *Z. Naturforsch.*, 1999, vol. 54c (12), 1075-83
- * XU, Y. J. et al. *J. Nat. Prod.*, 2000, vol. 63, 473-76 [0003]
- * JANPRASERT et al. *Phytochemistry*, 1993, vol. 32 (1), 67-69
- * ISHIBASHI et al. *Phytochemistry*, 1993, vol. 32 (2), 307-310
- * NIORT et al. *J. Nat. Prod.*, 1999, vol. 62 (12), 1632-1635
- * DIMRI et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, vol. 92 (20), 9263-7
- * GREGER et al. *Phytochemistry*, 2001, vol. 57 (1), 57-64
- * T.W. GREENE ; P.G.M. WUTZ. *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley Interscience, 1999
- * J. MARCH. *Advanced Organic Chemistry*. Wiley-Interscience
- * LAROCK, R.E. *Comprehensive Organic Transformations*. VCH Publishers, 1989, 963-995
- * TSUCHIYA et al. *Int. J. Cancer*, 1990, vol. 26 (2), 171-6
- * LEIBER et al. *Int. J. Cancer*, 1976, vol. 17 (1), 69-70
- * LOZZIO ; LOZZIO. *Blood*, 1975, vol. 45, 321-34
- * KAIGHN et al. *Invest. Urol.*, 1979, vol. 17, 16-23
- * WESTPHAL et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, vol. 132, 284-9
- * BECKER et al. *Anal Biochem*, 1994, vol. 221 (1), 78-84
- * NICOLETTI et al. *J. Immunol. Methods*, 1991, vol. 139, 271-79
- * LEE et al. *Chem Biol Interact.*, 1998, vol. 115 (3), 215-28
- * OBRIG et al. *J. Biol. Chem.*, 1971, vol. 246 (1), 174-181
- * COLLINS et al. *Nature*, 1977, vol. 270, 347-9
- * COLLINS. *Blood*, 1987, vol. 70 (5), 1233-44
- * FERRERO et al. *Blood*, 1983, vol. 61 (1), 171-9
- * SORGER et al. *Curr Opin Cell Biol.*, 1997, vol. 9 (6), 807-14
- * DARZYNKIEWICZ et al. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, vol. 803, 93-100
- * SORGER et al. *Curr Opin Cell Biol.*, 1997, vol. 9 (6), 807-14
- * GESCHER. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2000, vol. 34 (2), 127-35
- * CHANG et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (15), 3781-7
- * FROELICH-AMMON ; OSHEROFF. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270 (37), 21429-21432
- * PARDEE. *Science*, 1989, vol. 246, 693-8