República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112013015174-9 A2

(22) Data do Depósito: 16/12/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) Título: COMPOSTOS DE TIO-SEMICARBAZONA E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCER

(51) Int. Cl.: C07D 213/53; A61K 31/444; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 17/12/2010 AU 2010905539.

(71) Depositante(es): DES R RICHARDSON; DAVID B LOVEJOY.

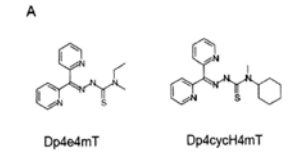
(72) Inventor(es): DES R RICHARDSON; DAVID B LOVEJOY.

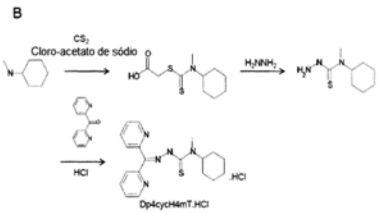
(86) Pedido PCT: PCT AU2011001631 de 16/12/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/079128 de 21/06/2012

(85) Data da Fase Nacional: 17/06/2013

(57) Resumo: COMPOSTOS DE TIO-SEMICARBAZONA E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCER A presente invenção se refere a compostos de dipridil-tio-semicarbazona, a composições farmacêuticas contendo aqueles compostos, e à aplicação daqueles compostos e composições no tratamento de câncer.





Compostos de tio-semicarbazona e aplicação no tratamento de câ

Este pedido reivindica a prioridade do Pedido
Provisório Australiano No. 2010905539, depositado em 17 de dezembro
conteúdo inteiro do qual é aqui incorporado por referência cruzada.

Campo Técnica

A presente invenção se refere a composto
semicarbazona e a sua aplicação em terapia. Mais particularmente, a invençã
a uma seleção de compostos de dipiridil-tio-semicarbazona, a co
farmacêuticas contendo aqueles compostos e à aplicação daqueles co
composições no tratamento de câncer.

Antecedentes da Técnica

Quelantes de ferro de tio-semicarbazona são uma
agentes anticâncer, que tem se constatado como sendo extremamente
seletivos contra inúmeros neoplasmas diferentes, tanto *in vitro* quanto *in v*
compostos agem dirigindo-se ao ferro, um elemento essencial para a síntese d
células de câncer. Quelantes de ferro foram incialmente desenvolvidos para
sobrecarga de ferro, tal como β-talassemia, com o quelante desferrioxamina (***D***
o tratamento mais amplamente usado para esta doença. No entanto, teste
examinando DFO contra neuroblastoma, constataram que este agente era
inibir a progressão deste câncer em alguns pacientes. Esses estudos prelimin
os primeiros a identificar o potencial de quelantes de ferro como agentes
Desde então, têm sido desenvolvidos quelantes de ferro designados espe
para o tratamento de câncer, com o quelante de ferro de tio-semicarbazona
piridina-2-carboxaldeído-tio-semicarbazona, (***Triapine***®) (*Vion Pharmaceuti*
Haven CT, Estados Unidos da América) entrando em inúmeros testes clínicos
e II.

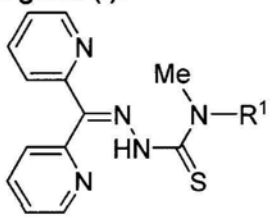
Quelantes de ferro de tio-semicarbazona agem
ao ferro e ao cobre, formando complexos redox ativos, conduzindo à pr
espécies de oxigênio reativas (EOR), que induzem a citotoxicidade de células
Um dos compostos mais ativos desenvolvidos até hoje é uma class
semicarbazonas do quelante de ferro, di-2-piridil-cetona-4,4-dimetil-3-tio-semi
(aqui abreviado como ***Dp44mT***), o qual é descrito no documento WO 2004/0
demonstrado que Dp44mT reduz, de maneiras marcante e significativa, o cres
inúmeros tumores diferentes, *in vitro* e *in vivo*, e constatou-se que ele é mais
menos tóxico o que a Triapine®. No entanto, estudos, usando doses não ótima
de Dp44mT, demonstraram que ele induziu alguma cardiotoxicidade em can

de metástase, NDRG1. NDRG1 inibe tanto o crescimento quanto a metást
como a angiogênese de câncer pancreático *in vivo*, conduzindo à reduzida pro
tumor. Além disso, NDRG1, recentemente, também tem sido relaciona
diferenciação aumentada de cânceres pancreáticos e seu potencial com
terapêutico promissor contra o câncer pancreático tem sido relatado (po
Kovacevic, Z. e D. R. Richardson (2006). *Carcinogenesis* 27: 2355-66; Maruya
Ono, *et al.* (2006). *Cancer Res* 66: 6233-42). NDRG1 tem inúmeros alvos n
chave em câncer pancreático, incluindo os supressores de tumor PTEN e SMA
os quais são regulados à montante em resposta a NDRG1. Portanto, NDRG
um alvo terapêutico promissor, especialmente para o tratamento de câncer p
Recentemente, constatou-se que NDRG1 é regulado à montante usando-s
anticâncer quelantes de ferro, *in vitro* e *in vivo*. Quelantes de ferro aum
expressão de NDRG1 *via* mecanismos dependentes de fator de transcrição in
hipóxia (HIF-1), embora as vias independentes de HIF-1 também têm sido o
Agentes anticâncer quelantes de ferro, portanto, fornecem uma importante op
para expressão de NDRG1 dirigida em células de câncer por depleção de ferro

Existe uma demanda por tratamentos novos e a
para o câncer. A presente invenção é dirigida a uma seleção de compos
semicarbazona, que inibem, de maneira vantajosa, a proliferação celular e c
ser úteis para o tratamento de câncer.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção se refere a
de tio-semicarbazona da fórmula geral (I):



(I)

na qual R^1 é ciclo-hexila ou etila;
e sais, hidratos e solvatos do mesmo.

Em uma modalidade preferida, a invenção se
composto di-2-piridil-cetona 4-etil-4-metil-3-tio-semicarbazona (abreviado a
Dp4e4mT), e sais, hidratos e solvatos do mesmo.

Em outra modalidade preferida, a invenção se
composto di-2-piridil-cetona 4-ciclo-hexil-4-metil-3-tio-semicarbazona (abrev
como ***Dp4cycH4mT***), e sais, hidratos e solvatos do mesmo.

Em modalidades preferidas, os sais

uma modalidade particularmente preferida da invenção.

Em outros aspecto da invenção se refer composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (I), ou um ou solvato do mesmo, em conjunto com um excipiente, diluente ou farmaceuticamente aceitável.

Em um aspecto adicional, a presente invenção um método de tratamento de câncer em um mamífero, o método compre administração, a um mamífero que dela necessite, de uma quantidade efi composto de fórmula (I), ou de um sal, hidrato ou solvato do mesmo, c composição farmacêutica dos mesmos. Em modalidades preferidas, o mamífer humano.

Em outro aspecto, a presente invenção se aplicação de um composto de fórmula (I), ou de um sal, hidrato ou solvato do fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer.

Em um aspecto adicional, a invenção se re composto de fórmula (I), ou a um sal, hidrato ou solvato do mesmo, composição farmacêutica dos mesmos, para o tratamento de câncer.

Os compostos da invenção são úteis para o trat uma ampla variedade de cânceres, incluindo tumores sólidos e não sólidos mas não limitados a, melanoma, câncer de pele, câncer do seio, câncer d câncer da bexiga, câncer do fígado, câncer gastrointestinal, câncer do cólon câncer do cérebro, câncer da cabeça e do pescoço, câncer ósseo, câncer p câncer uterino, câncer ovariano, câncer cervical, câncer do pulmão, assim com hematológicos (por exemplo, leucemias e linfomas). Em modalidades preferida é selecionado a partir de câncer pancreático, câncer do pulmão e câncer do c modalidades particularmente preferidas, o câncer é câncer pancreático. modalidades particularmente preferidas, o câncer é câncer do pulmão. modalidades particularmente preferidas, o câncer é tumor do cérebro. Em m preferidas, os compostos da invenção são úteis para o tratamento de tumor Em outras modalidades preferidas, os compostos da invenção são úte tratamento de tumores não sólidos.

Outras modalidades da invenção descritas direcionadas a um método de inibição de proliferação celular, o método comp a colocação em contato de uma ou mais células com uma quantidade efi composto de fórmula (I), ou de um sal, hidrato ou solvato do mesmo. As célu estar *in vitro* ou *in vivo*. De preferência, as células são células de mamíferos.

Ao longo de todo este relatório descritivo, a mo

"compreende" ou "compreendendo", serão entendidas a implicar na inclus
elemento, número inteiro ou etapa mencionados ou a grupos de elementos, c
inteiros ou de etapas mencionados, mas não na exclusão de qualquer outro
número inteiro ou etapa ou grupos de elementos, de números inteiros ou
Portanto, no contexto deste relatório descritivo, a palavra "compreendend
"incluindo principalmente, mas não necessariamente somente".

Qualquer discussão de documentos, atos,
dispositivos, artigos ou os similares, que tenham sido incluídos no presen
descritivo, é meramente para a finalidade de fornecimento de um contex
presente invenção. Ela não deve ser tomada como uma admissão de que qu
ou todas essas matérias façam parte da base da técnica anterior ou
conhecimento geral comum no campo relevante em relação à presente inv
Austrália ou em qualquer outro lugar, antes da data de prioridade de cada re
deste pedido de patente.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1. **A.** Formula estrutural dos compostos D
Dp4cycH4mT. **B.** Esquema sintético geral para Dp4cycH4mT.

Figura 2. Atividade antiproliferativa de Dp
Dp4cycH4mT contra neuroepitelioma SK-N-MC.

Figura 3. Atividade antiproliferativa de Dp4cycH4
linhagens de células de câncer pancreático.

Figura 4. Estudos de efluxo de ferro (A) e de assi
ferro (B) em células de neuroepitelioma SK-N-MC.

Figura 5. Crescimento de carcinoma do pulmã
em camundongos nus. Estudo de administração i.v. de Dp4e4mT.

Figura 6. Crescimento de carcinoma do pulmão c
em camundongos nus. Estudo de administração i.v. de Dp4e4mT: avaliação
cardíaca.

Figura 7. Crescimento de carcinoma do pulmão c
em camundongos nus. Estudo de administração oral de Dp4e4mT: **A.** Tamanh
versus dias de tratamento. **B.** Peso do tumor.

Figura 8. Carcinoma do pulmão em camundo
Estudo de administração oral de Dp4e4mT: Análise histológica de coraçã
fígado.

Figura 9. Crescimento de carcinoma pancreático
1 em camundongos nus. Estudo de administração i.v. de Dp4cycH4mT: **A.** Ta
tumor *versus* dias de tratamento. **B.** Peso do tumor. **C.** Fotografias de

Figura 10. Crescimento de carcinoma pancreátic
1 em camundongos nus. Estudo de administração i.v. de Dp4cycH4m
histológica de coração, baço e fígado.

Figura 11. Crescimento de carcinoma pancreátic
1 em camundongos nus. Estudo de administração i.v. de Dp4cycH4mT:
Dp4cycH4mT em NDRG-1, moléculas do ciclo celular e TfR.

Figura 12. Efeito de DFO e quelantes tio-sem
em formação de metHb *in vitro*. CVSs integrais foram incubadas com quelante
37°C durante 3 h. As células foram lisadas com H_2O ultrapura e os níveis de m
medidos espectrofotometricamente. Os resultados são a média ± DP a
experimentos.

Figura 13. Efeito de quelantes de tio-semicar
formação de metHb *in vivo*. MetHb depois de tratamento com Dp44mT, T
Dp4cycH4mT *in vivo*, em uma dose de 6 mg/Kg administrada intravenosament
caudal. Camundongos no grupo de controle foram tratados somente com veíc
minutos após a administração, o sangue integral foi coletado para determi
níveis de metHb.

Figura 14. Efeito de quelantes de tio-semicar
formação de metMb *in vivo*. Os níveis de MetMb depois de tratamento com
Triapine® ou Dp4cycH4mT *in vivo*, em uma dose de 6 mg/Kg ad
intravenosamente *via* a veia caudal. Camundongos no grupo de controle fora
somente com veículo. Em 30 minutos após a administração, corações inte
coletados para determinação dos níveis de metMb.

Definições

As seguintes são algumas definições que poder
no entendimento da descrição da presente invenção. Pretende-se que es
definições gerais e, de maneira alguma, devem limitar o escopo da presente in
relação àquelas palavras ou expressões isoladamente, mas devem ser conce
um melhor entendimento da descrição que se segue.

A menos que o contexto exija de outra maneira o
mencionado de maneira específica o contrário, números inteiros, etapas ou ele
invenção, mencionados aqui como números inteiros, etapas ou elementos
claramente englobam as formas tanto no singular quanto no plural dos núme
etapas ou elementos mencionados.

Os técnicos especializados no assunto aprecia
invenção descrita aqui é suscetível a variações e modificações diferentes
especificamente descritas. Deve ser entendido que a invenção inclui todas tais

e compostos, aos quais se refere ou que sejam indicados neste relatório individualmente ou coletivamente, e todas e quaisquer combinações de quais ou mais etapas, características, composições e compostos mencionados.

Os compostos de fórmula (I) são ligantes capazes de quelar íons de metais de transição, tais como ferro (Fe(II) Consequentemente, ao longo de todo este relatório descritivo, pode-se compostos da invenção como "ligantes", "quelantes" ou "quelantes de ferro". A todo este relatório descritivo, uma referência a "composto(s)" ou "que "ligante(s)" da invenção é uma referência a compostos de fórmula (I), inclu hidratos e solvatos do mesmo, a menos se expressamente indicado de outra m

A presente invenção inclui dentro de seu escop formas isoméricas dos compostos de fórmula (I) , e de sais, hidratos e so mesmos, descritos aqui, incluindo todos os isômeros diastereomérico (in isômeros *cis/trans*), racemados e enanciômeros.

No contexto desta invenção, a palavra "admini variações desta palavra, incluindo "administrar" e "administração", incluem col contato, aplicação, entrega ou fornecimento de um composto ou de uma com invenção a um organismo, a um mamífero ou a uma superfície, por quaiso apropriados.

No contexto deste relatório descritivo, a palavra inclui seres humanos e indivíduos de qualquer espécie de importância social, ou em pesquisa, incluindo, mas não limitados a, membros dos gêneros ovin equino, porcino, felino, canino, primatas (incluindo primatas humanos e não hu roedores, murino, caprino, leporino e de aves. Em modalidades preferidas, o r um ser humano.

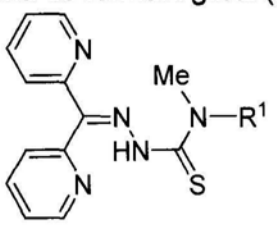
No contexto deste relatório descritivo, a palavra "t se refere a todas e quaisquer aplicações, que remediem um estado ou patológicos, que previnam o estabelecimento de doenças, ou, de outra ma previnam, impeçam, retardem ou revertam a progressão de doenças ou outros indesejáveis, de qualquer maneira que seja. Portanto, para que se evitem referências aqui a "tratamento" incluem referências a tratamento curativo, profilático.

No contexto deste relatório descritivo, a "quantidade eficaz" inclui dentro de seu significado uma quantidade suficiente tóxica, de um composto ou de uma composição da invenção, para fornece terapêutico desejado. A quantidade exata necessária variará de sujeito pa

o modo de administração, e assim por diante. Portanto, não é possível espe
"quantidade eficaz" exata. Entretanto, para uma dado caso, uma "quantid
apropriada pode ser determinada por um técnico especializado no assunto
somente experimentação de rotina.

Descrição Detalhada de Modalidades da Invenção

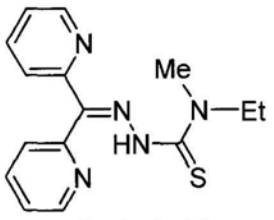
A presente invenção é dirigida a uma seleção de
de tio-semicarbazona, que apresentam propriedades antiproliferativas e q
portanto, ser úteis no tratamento de câncer. Em particular, a presente invençã
a compostos de tio-semicarbazona de fórmula geral (I):



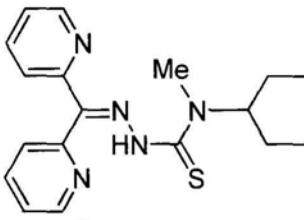
(I)

na qual R^1 é ciclo-hexila ou etila;
e sais, hidratos e solvatos do mesmo.

Mais particularmente, a presente invenção de re
piridil-cetona-4-etil-4-metil-3-tio-semicarbazona (Dp4e4mT) e a di-2-piridil-cet
hexil-4-metil-3-tio-semicarbazona (Dp4cycH4mT), e a sais, hidratos e so
mesmos:



Dp4e4mT

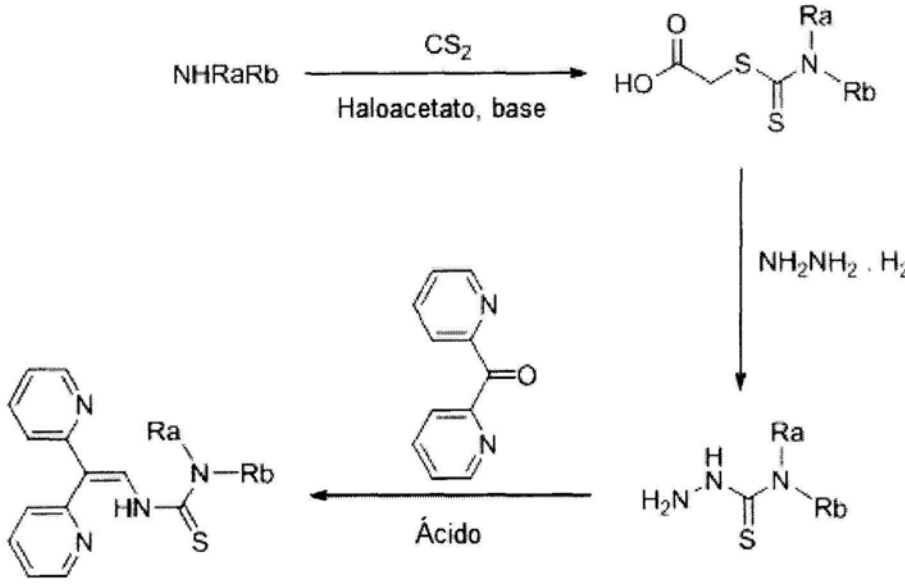


Dp4cycH4mT

Compostos de acordo com a presente inve
quelantes de ferro e podem quelar Fe(II) e Fe(III). Consequentemente, com
ferro (isto é, complexos de Fe(II) e de Fe(III)) dos compostos de fórmula (I) sã
englobados pela presente invenção.

Compostos de fórmula (I) de acordo com a
invenção, os sais, hidratos ou solvatos dos mesmos, podem ser preparados po
conhecidos pelos técnicos especializados no assunto, incluindo, por e
Condensação com Base de Schiff de uma imina com uma cetona, conforme de
exemplo, em *Advanced Organic Chemistry*, 4ª Ed. (John Wiley & Sons, New Y
e em *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5ª Ed. (John Wiley & S
York, 1989).

Um esquema sintético geral exemplificat
preparação de compostos de fórmula (I), é mostrado abaixo no Esquema 1:



Esquema 1

A primeira etapa envolve a formação de um ditio-
de carbóxi-metila a partir da reação de uma amina secundária (NHRaRb) com
de carbono. Os grupos Ra e Rb da amina secundária podem ser iguais ou d
podem ser uma C_{1-6}-alquila linear ou cíclica. Em modalidades preferidas da in
acordo com o Esquema 1, Ra é metila e Rb é etila ou ciclo-hexila. Exemplo
acetatos adequados incluem cloro-acetato e bromo-acetato. Bases adequadas
conhecidas pelos técnicos especializados no assunto e incluirão, por exemplo
de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de lítio, amônia, dietila-amina, e as
Tipicamente, a primeira etapa é realizada em temperatura ambiente (por exem
de 20-25°C). O processamento com ácido padrão (por exemplo, ácido cloríd
sulfúrico, etc.) fornece o ditio-carbamato de carbóxi-metila.

A próxima etapa envolve a formação de um com
intermediário de tio-semicarbazida, por reação do ditio-carbamato de carbóxi-
hidrato de hidrazina. Tipicamente, essa etapa é realizada em água com ac
suave em uma temperatura na faixa de cerca de 25°C a cerca de 60°C. De mar
é usado um excesso molar de hidrato de hidrazina.

A seguir, o composto de tio-semicarbazida é r
uma reação de Condensação com Base de Schiff com di-2-piridil-cetona, par
composto de tio-semicarbazona de fórmula (I). Tipicamente, essa reação
realizada em qualquer solvente polar adequado, tais como etanol,
tetraidrofurano, e os similares. Tipicamente, a reação é realizada por aquec

ser durante cerca de 1 a cerca de 24 horas, por exemplo, durante cerca de 2 a horas, mais tipicamente, durante cerca de 2 a cerca de 4 horas. Opcionalme produzida durante a reação de condensação pode ser removida pela inclu agente de secagem, por exemplo, $TiCl_4$ ou uma peneira molecular, ou por azeotrópica.

Formas de sal dos compostos de fórmula (I) prontamente preparadas usando-se técnicas conhecidas pelos técnicos esp no assunto. Por exemplo, sais de adição de ácido podem ser preparados por de um composto de fórmula (I) em um solvente não polar adequado, tais co dicloro-metano, etc., e agitação com um ácido aquoso correspondendo ao sa Por exemplo, ácido clorídrico forneceria o sal de cloridrato, ácido nítrico forn de nitrato, ácido sulfúrico forneceria o sal de sulfato, etc.

Compostos de fórmula geral (I), ou seus sais, solvatos, podem ser purificados usando-se técnicas padrão conhecidas pel especializados no assunto. Em modalidades preferidas, os compostos de podem ser purificados por cristalização a partir de um solvente adequado ou solventes. Solventes adequados seriam conhecidos pelos técnicos especia assunto e incluem, por exemplo, metanol, etanol, acetonitrila, acetato de dimetil-formamida, sulfóxido de dimetila, e misturas dos mesmos. modalidades, o produto pode ser recristalizado a partir de uma mistura de compreendendo um ou mais solventes orgânicos, tais como aqueles listado água. Depois de purificação, os compostos de fórmula (I) podem ser isolad forma que seja pelo menos cerca de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % p

Terapia

A presente invenção também se refere à ap compostos de tio-semicarbazona de fórmula geral (I), e sais, hidratos e so mesmos, em terapia. Em particular, os compostos de tio-semicarbazona de apresentam propriedades antiproliferativas e, portanto, podem ser úteis no tra câncer. Os compostos de tio-semicarbazona da presente invenção são qu ferro. Os compostos da invenção podem ser úteis para o tratamento de u variedade de cânceres (tumores), incluindo, mas não limitados a, melanoma, pele, câncer do seio, câncer da próstata, câncer da bexiga, câncer do fíga gastrointestinal, câncer do cólon e do reto, câncer do cérebro, câncer da ca pescoço, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer uterino, câncer ovaria cervical, câncer do pulmão, assim como tumores hematológicos (por exemplo, e linfomas). Em modalidades particularmente preferidas, o câncer é câncer p

preferidas, os compostos da invenção são úteis para o tratamento de tumor
Em outras modalidades preferidas, os compostos da invenção são úte
tratamento de tumores não sólidos.

O câncer pancreático é uma doença devastad
fatal em 98-100 % dos casos dentro dos primeiros 5 anos do diagnósti
sobrevivência a esta doença sendo a mesma hoje como era há 20 anos atrás
tratamento atualmente disponível para o câncer pancreático é o agente
gemcitabina, que é um análogo do nucleosídeo deoxicitidina. A gemcitabina
droga, que é convertida dentro da célula nos metabólitos ativos di- e trifosfato
deoxicitidina (dFdCDP, dFdCTP). O sucesso de gemcitabina no tratamento
pancreático tem sido limitado. De fato, testes clínicos usando-se esse a
demonstrado que, em média, ele aumenta a expectativa de vida de pac
somente cerca de 3 meses. A gemcitabina tem sido combinada com outro
anticâncer, tais como 5-fluoro-uracila (5-FU) resultando em algum aperfeiço
sua atividade. No entanto, o prognóstico para pacientes de câncer p
permanece funesto.

Surpreendentemente, os compostos de tio-sem
da presente invenção, ou sais, hidratos ou solvatos dos mesmos, de maneira
exibem propriedades antiproliferativas, que que são pelo menos tão boas
preferência, melhores do que, as dos agentes anticâncer conhecidos. Por ex
modalidades preferidas, os compostos de tio-semicarbazona da invenção
eficazes na inibição de células de câncer (por exemplo, células de câncer pa
quando comparados à gemcitabina e 5-fluoro-uracila. Os compostos da
invenção (usados isoladamente ou em combinação com outros agentes anti
como parte de um regime terapêutico) são, portanto, agentes anticâncer a
possuindo uma ou mais propriedades terapêuticas vantajosas, comparados ac
anticâncer existentes.

Outra vantagem surpreendente e vantajosa da
invenção é que os compostos de tio-semicarbazona da presente invenção
hidratos ou solvatos dos mesmos, inibem, de maneira substancial, o cresc
tumor pancreático, o qual é bem conhecido como sendo uma forma
particularmente agressiva. Os compostos da presente invenção podem, po
usados, isoladamente ou em combinação, com outros agentes anticâncer ou c
de um regime terapêutico, no tratamento de câncer pancreático. Em m
preferidas, o composto de tio-semicarbazona é Dp4e4mT, ou um sal ou
mesmo. Em outras modalidades preferidas, a tio-semicarbazona é Dp4cycH4
sal ou hidrato do mesmo.

presenta invenção é que os compostos de tio-semicarbazona da present
podem ser mais eficazes e menos tóxicos do que o potente compos
semicarbazona antiproliferativo di-2-piridil-cetona-4,4-dimetil-3-tio-sem
(Dp44mT). Em modalidades particularmente preferidas, os composto
semicarbazona da presente invenção, por exemplo, Dp4cycH4mT ou Dp4e4r
substancialmente menos cardiotoxicidade do que Dp44mT.

A proteína mioglobina (Mb) desempenha um
papel no armazenamento e doação aos músculos de oxigênio e é uma
monomérica em relação à hemoglobina. Em testes clínicos de câncer,
Triapine®, a indução de met-hemoglobinemia e hipóxia, tem sido observada
efeito colateral limitante de dose (Attia S, Kolesar J, *et al.*, (2008). *Invest New*
369-379 ; Ma B, Goh BC, *et al.* (2008). *Invest New Drugs* 26: 169-73). Em pa
estejam se submetendo à quimioterapia para câncer, essa complicação é i
uma vez que estes pacientes frequentemente reduziram o seu desempenho r
Consequentemente, a produção excessiva de metHb reduz a utilidade
Triapine®. Os compostos da presente invenção, em particular, o composto Dp
possuem uma vantagem adicional em relação a outros agentes anticâncer p
não induzem a formação de met-hemoglobina (***metHb***) e/ou de metmioglobin
ou os compostos induzem a formação de metHB e/ou de metMb em uma
significativamente menor do que outros agentes anticâncer, tais como
Triapine®, embora mantendo a atividade antitumor.

Formulações

De acordo com a presente invenção, quando usa
tratamento ou a prevenção de uma infecção, de uma doença ou de um dis
composto(s) da invenção pode(m) ser administrado(s) isoladamente ou em c
com outros agentes, como parte de um regime terapêutico. Os compostos
administrados como uma formulação farmacêutica ou veterinária, que compr
menos um composto de acordo com a invenção. O(s) composto(s) também
estar presente(s) como sias adequados, incluindo sais farmaceuticamente acei

Composições farmacêuticas adequadas para a
compostos da presente invenção e métodos para sua preparação serão pr
evidentes aos técnicos especializados no assunto. Tais composições e métodc
preparação podem ser encontrados, por exemplo, em Remington's Phar
Sciences, 19ª Edição (Mack Publishing Company, 1995).

Em outras modalidades, o(s) composto(s) da
invenção pode(m) ser incluído(s) em regimes de tratamento de combinação co
e/ou outros tratamentos ou agentes terapêuticos conhecidos, tais como outro

agentes adjuvantes ou profiláticos. Agentes adequados são listados, por ex
Merck Index, An Encyclopaedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12ª E
conteúdo inteiro do qual é aqui incorporado por referência.

Por exemplo, quando usados no tratamento d
sólidos, os compostos da presente invenção podem ser administrados com u
agentes quimioterapêuticos ou combinações dos mesmos, tais como: adriami
docetaxel, fluoro-uracila, melfalan, cisplatina, alfa-interferon, COMP (ciclo
vincristina, metotrexato e prednisona), etoposida, mBACOD (metotrexato, b
doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina e dexametasona), PROMA
(prednisona, metotrexato (*w/leucovin rescue*), doxorubicina, ciclofosfami
etoposida/mecloretamina, vincristina, prednisona e procarbazina), vincristina, v
angioinibinas, TNP-470, polissulfato de pentosano, fator de plaquetas 4, angios
609, SU-101, CM-101, tecgalan, talidomida, SP-PG e os similares.

Outros exemplos de agentes anticâncer incluem a
alquilação, tais como mostardas de nitrogênio (por exemplo, mecloretamina
clorambucil, ciclofosfamida, (L-sarcolisina), e ifosfamida), etileno-iminas
melaminas (por exemplo, hexametil-melamina, tiotepa), sulfonatos de al
exemplo, busulfan), nitroso-uréias (por exemplo, carmustina, lomustina, s
estreptozocina), triazenos (por exemplo, dacarbazina (dimetil-triazeno
carboxamida), temozolomida), análogos de ácido fólico (por exemplo, me
análogos de pirimidina (por exemplo, 5-fluoro-uracila, floxuridina, citarabina, ge
análogos de purinas (por exemplo, 6-mercapto-purina, 6-tio-guanina, pentos
deoxicoformicina), cladribina, fludarabina), alcaloides de vinca (por exemplo, v
vincristina), taxanos (por exemplo, paclitaxel, docetaxel), epipodofillotox
exemplo, etoposida, teniposida), camptotecinas (topotecan, irinotecan), antibi
exemplo, actinomicina D, daunorubicina (daunomicina, rubidomicina), dox
bleomicina, mitomicina C, metramicina), enzimas (por exemplo, L-aspa
interferon-alfa, interleucina-2, cisplatina, carboplatina, mitoxantrona, hid
procarbazina, mitotano, amino-glutetimida, imatinib, adrenocorticosteróides (po
prednisona), progestinas (por exemplo, caproato de hidróxi-progesterona, a
medroxiprogesterona, acetato de megestrol), estrogênios (por exemplo, dietil-e
etinil-estradiol), antiestrogênios (por exemplo, tamoxifen, anastrozol), androg
exemplo, propionato de testosterona, fluoximesterona), antiandrogênios (por
flutamida), e análogos de hormônios que liberam gonadotropina (por
leuprolida).

Em modalidades particularmente preferidas, um
compostos da invenção podem ser usados em combinação com gemcitabina o

Regimes de combinação podem envolver os age
sendo administrados em conjunto, sequencialmente ou espaçados entre si
apropriado em cada caso. Combinações de agentes ativos, incluindo com
invenção, podem ser sinergísticas.

Por sal farmaceuticamente aceitável, entende-
sais dentro do escopo de julgamento médico seguro, são adequados para ap
contato com os tecidos de seres humanos e animais inferiores sem toxicidad
resposta alérgica indevidas, e os similares, e são sopesados com um
benefício/risco razoável. Sais farmaceuticamente aceitáveis são bem con
técnica. Sais de adição de ácido, tais como sais de cloridrato, são uma
particularmente preferida da invenção.

Por exemplo, sais farmaceuticamente
adequados, de compostos de acordo com a presente invenção, podem ser
por misturação dos compostos da invenção com um ácido farmaceuticament
(incluindo ácidos inorgânicos e orgânicos) ou uma base farmaceuticament
(incluindo bases inorgânicas e orgânicas). Sais farmaceuticamente aceitáveis
dos compostos da presente invenção, portanto, incluem sais de adição de ác
de bases.

Sais farmaceuticamente aceitáveis adequados in
não estão limitados a, ácido acético, ácido benzeno-sulfônico, ácido benz
canforsulfônico, ácido cítrico, ácido eteno-sulfônico, ácido fumárico, ácido glicô
glutâmico, ácido bromídrico, ácido clorídrico, ácido isetiônico, ácido lático, ácid
ácido málico, ácido malônico, ácido mandélico, ácido metano-sulfônico, ácid
ácido nítrico, ácido pamóico, ácido pantotênico, ácido fosfórico, ácido oxá
succínico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido p-tolueno-sulfônico, e os sim
de adição de ácidos atualmente preferidos são os sais de cloridrato, de
fosfórico sulfúrico, e muitíssimo particularmente preferido é o sal de cloridrato.

Sais de bases adequados podem ser formados
bases que formem sais não tóxicos. Exemplos incluem os sais de alumínio
benzatina, cálcio, colina, dietil-amina, diolamina, glicina, lisina, magnésio, m
olamina, potássio, sódio, trometamina e zinco.

Hemi-sais e ácidos e de bases também p
formados, por exemplo, sais de hemi-sulfato e de hemi-cálcio.

S. M. Berge *et al.* descrevem sais farmace
aceitáveis em detalhes em *J. Pharmaceutical Sciences,* 1977, *66*:1-19, e um
sobre sais adequados é fornecida por Handbook of Pharmaceutical Salts:

Os sais podem ser preparados *in situ* durante o
e a purificação finais dos compostos da invenção, ou separadamente, por
composto de base livre com um ácido orgânico adequado. Sais de adição
representativos incluem sais de acetato, adipato, alginato, ascorbato, asparato
sulfonato, benzoato, bissulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfona
digliconato, ciclopentano-propionato, dodecil-sulfato, etano-sulfonato, fuma
heptanoato, glicerol-fosfato, hemi-sulfato, heptanoato, hexanoato, bromidrato,
iodidrato, 2-hidróxi-etano-sulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril-sulfa
maleato, malonato, metano-sulfonato, 2-naftaleno-sulfonato, nicotinato, nitra
oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, fosfa
pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartarato, tio-cianato, toluen
undecanoato, valerato, e os similares. Sais de metais alcalinos e de meta
terrosos incluem sais de sódio, lítio, potássio, cálcio, magnésio, e os simila
como cátions não tóxicos de amônio, amônio quaternário e de amina, incluind
limitados a, amônio, tetrametil-amônio, tetraetil-amônio, metil-amina, dim
trimetil-amina, trietil-amina, etil-amina, trietanol-amina, e os similares.

Modos de administração convenientes de com
invenção incluem administração parenteral (por exemplo, técnicas de inje
infusão subcutânea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal,
intraocular, intranasal, intraventricular), intraperitoneal, oral, inalação,
transdérmica, cremes ou géis ou pós tópicos, ou administração retal. Depende
de administração, a formulação e/ou o composto podem ser revestidos com u
para proteger o composto da ação de enzimas, ácidos e outras condições na
possam inativar a atividade terapêutica do composto.

Dispersões dos compostos de acordo com a
também podem ser preparadas em glicerol, poli(etileno glicóis) líquidos, e mi
mesmos e em óleos. Sob condições ordinárias de armazenamento e de uso, pr
farmacêuticas podem conter um preservante para prevenir o crescimento
organismos.

Composições farmacêuticas adequadas para
incluem soluções (para agentes ativos solúveis em água adequados) ou
aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de so
dispersões injetáveis estéreis. Idealmente, a composição é estável sob as co
fabricação e de armazenamento e pode incluir um preservante para es
composição contra a ação de contaminação de micro-organismos, tais como b
fungos.

Em uma modalidade da invenção, o(s) compo

um veículo ingerível assimilável. O(s) composto(s) e outros ingredientes tamb
ser encerrados em uma cápsula de gelatina de concha dura ou macia, comp
tabletes ou incorporados diretamente em uma dieta individual. Para ad
terapêutica oral, o(s) composto(s) podem ser incorporados com excipientes e
forma de tabletes ingeríveis, tabletes bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, s
xaropes, *wafers*, e os similares. Adequadamente, tais composições e preparaç
conter pelo menos 1 % em peso de composto ativo. Obviamente, a percenta
composto(s) da invenção em composições e preparações farmacêuticas
variada. Por exemplo, de maneira conveniente, a quantidade pode variar de c
a cerca de 90%, de cerca de 5% a cerca de 80%, de cerca de 10% a cerca d
cerca de 15% a cerca de 65%; de cerca de 20% a cerca de 60%, de cerca
cerca de 50%, de cerca de 30% a cerca de 45%, ou de cerca de 35% a cerca
peso da unidade de dosagem. A quantidade de composto em co
terapeuticamente úteis é tal que uma dosagem adequada possa ser obt
adequadas podem ser obtidas por administrações únicas ou múltiplas.

A expressão "veículo farmaceuticamente
pretende incluir solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antiba
antifúngicos, agentes de retardamento de absorção e isotônicos, e os similares
tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativos é bem co
técnica. Exceto e tanto quanto quaisquer meios ou agentes sejam incompatí
composto, o uso dos mesmos nas composições terapêuticas e nos m
tratamento e de profilaxia é contemplado. Compostos ativos suplementare
podem ser incorporados às composições de acordo com a presente in
especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma u
dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem.

A expressão "forma unitária de dosagem", confo
aqui, se refere a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagen
para o indivíduo a ser tratado; cada unidade contendo uma quantidade pré-d
de composto(s) calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em assoc
o veículo farmacêutico necessário. O(s) composto(s) pode(m) ser formula
administração conveniente e eficaz, em quantidades eficazes, com u
farmaceuticamente aceitável adequado em uma unidade de dosagem aceitáve
de composições contendo ingredientes ativos suplementares, as dosa
determinadas por referência à dose usual e à maneira de administ
mencionados ingredientes.

Em uma modalidade, o veículo pode ser u

de dosagem formulada como grânulos, tabletes ou cápsulas entericamente para administração oral.

Estão também incluídas no escopo desta formulações de liberação retardada ou estendida.

Em uma modalidade preferida, o(s) compo invenção pode(m) ser administrado(s) por injeção. No caso de soluções in veículo pode ser um meio solvente ou de dispersão contendo, por exemplo, exemplo, água para injeção), salina, solução de glicose à 5 %, etanol, exemplo, glicerol, propileno glicol, e poli(etileno glicol) líquido, e os similares adequadas dos mesmos, e óleos vegetais. A fluidez apropriada pode ser m exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção d de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos (po polissorbato 80). A prevenção da ação de micro-organismos pode ser cons inclusão de vários agentes antibacterianos e/ou antifúngicos. Agentes adeq bem conhecidos pelos técnicos especializados no assunto e incluem, por parabenos, cloro-butanol, fenol, álcool benzílico, ácido ascórbico, timero similares. Em muitos casos, pode ser preferível incluir agentes isotônicos, po açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio, na com absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada por in composição, de um agente que retarde a absorção, por exemplo, monoes alumínio e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser prepa incorporação do análogo na quantidade necessária em um solvente apropriad ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessári por esterilização filtrada. De maneira geral, as dispersões podem ser prepa incorporação do análogo a um veículo estéril, que contenha um meio de disper e os outros ingredientes necessários, daqueles enumerados acima.

Tabletes, pastilhas, pílulas, cápsulas e os similare podem conter o seguinte: um aglutinante, tais como goma de tragacanto, acá de milho ou gelatina; excipientes, tal como fosfato dicálcico; um agente de desi tal como amido de milho, amido de batata, ácido algínico e os similares; um lu tal como estearato de magnésio; e um agente de adoçamento, tais como lactose ou sacarina ou um agente flavorizante, tais como hortelã-pimenta gaultéria ou flavorizante de cereja. Quando a forma unitária de dosagem for um ela pode conter, em adição a materiais do tipo acima, um veículo líquido. Vá materiais podem estar presentes como revestimentos ou para, de outra

pode conter o análogo, sacarose como o agente de adoçamento, metil-parabenos como preservantes, um corante e um agente flavorizante, tal com cereja ou de laranja. Obviamente, qualquer material usado na preparação d forma unitária de dosagem deve ser farmaceuticamente puro e substancial tóxico nas quantidades empregadas. Em adição, o análogo pode ser inco preparações e às formulações de liberação sustentada.

De preferência, a composição farmacêutica p adicionalmente um tampão adequado para minimizar a hidrólise ácida. A tamponamento adequados são bem conhecidos pelos técnicos especia assunto e incluem, mas não estão limitados a, fosfatos, citratos, carbonatos dos mesmos.

Administrações únicas ou múltiplas das co farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser realizadas. U especializado no assunto seria capaz, por experimentação de rotina, de determ de dosagem não tóxicos, eficazes, do composto e/ou da composição da inve padrão de administração, que seria adequado para tratar as doenças e/ou as às quais os compostos e as composições sejam aplicáveis.

Além disso, será evidente, para um técnico espec assunto, que o curso ótimo de tratamento, tal como u número de doses do co da composição da invenção dadas por dia durante um número definido de dias verificado usando-se curso convencional de testes de determinação de tratame

De maneira geral, uma dose eficaz por 24 horas na faixa de cerca de 0,0001 mg a cerca de 1.000 mg por Kg de peso adequadamente, de cerca de 0,001 mg a cerca de 750 mg por Kg de peso do cerca de 0,01 mg a cerca de 500 mg por Kg de peso do corpo; de cerca de cerca de 500 mg por Kg de peso do corpo; de cerca de 0,1 mg a cerca de 250 de peso do corpo; ou de cerca de 1,0 mg a cerca de 250 mg por Kg de peso Mais adequadamente, uma dosagem eficaz por 24 horas pode estar na faixa d 1,0 mg a cerca de 200 mg por Kg de peso do corpo; de cerca de 1,0 mg a ce mg por Kg de peso do corpo; de cerca de 1,0 mg a cerca de 50 mg por Kg d corpo; de cerca de 1,0 mg a cerca de 25 mg por Kg de peso do corpo; de ce mg a cerca de 50 mg por Kg de peso do corpo; de cerca de 5,0 mg a cerca de Kg de peso do corpo; ou de cerca de 5,0 mg a cerca de 15 mg por Kg de peso

Alternativamente, uma dosagem eficaz pode ser de acordo com a Área de Superfície do Corpo (***ASC***) do paciente a ser tratad de um paciente pode ser prontamente calculada usando-se métodos conhec técnicos especializados no assunto. Uma dose adequada, de maneira geral, p

na faixa de cerca de 10 a cerca de 500 mg/m^2, cerca de 25 a cerca de 350 m
de 25 a cerca de 300 mg/m^2, cerca de 25 a cerca de 250 mg/m^2, cerca de 50
250 mg/m^2, e cerca de 75 a cerca de 150 mg/m^2.

A invenção será agora descrita com refer
seguintes exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1 – Síntese de Dp4cych4mT, Dp4e4mT e sais de correspondentes

Metodologia:

Os quelantes di-2-piridil-cetona-4-etil-4-
semicarbazona (***Dp4e4mT***) e di-2-piridil-cetona-4-ciclo-hexil-4-metil-3-tio-sem
(***Dp4cycH4mT***) foram sintetizados usando-se uma combinação de
estabelecidos (Scovill, J P (1990). *Phosphorous, Sulphur and Silicon*
Richardson, D.R. *et al.* (2006). *J Med Chem.* 49: 6510-6521). De mane
dissulfeto de carbono (0,2 moles) foi adicionado gota a gota a N-metil-ciclo-hex
N-etil-metil-amina (0,2 moles) em solução de NaOH (250 mL, 0,8 M) de deixa
até que a camada orgânica quase desaparecesse. A seguir, cloro-acetato de
moles) foi adicionado ao extrato aquoso e deixados reagir durante um
temperatura ambiente. A adição de HCl concentrado (25 mL) deu o intermed
de tio-carbamato de carbóxi-metila. Aproximadamente, 0,08 moles de interm
tio-carbamato de carbóxi-metila foram dissolvidos em 20 mL de hidrato de hidr
10 mL de água. Isso foi seguido por cinco ciclos de aquecimento suave (até a
de fumos) e de resfriamento. A solução foi, então, deixada repousar até q
formados cristais brancos finos de intermediário de tio-semicarbazida. Uma
intermediário de tio-semicarbazida (10 mmoles) em água (15 mL) foi adiciona
piridil-cetona (10 mmoles) dissolvida em EtOH (15 mL). A seguir, 5 gotas de ác
glacial foram adicionadas e a mistura foi refluxada durante 2 horas e resfriada
para dar o precipitado amarelo de Dp4cycH4mT ou de Dp4e4mT, respec
Finalmente, Dp4cycH4mT ou Dp4e4mT foi dissolvido em volume mínimo de he
HCl equimolar foi adicionado para dar o sal de HCl correspondente. O es
síntese é mostrado na Figura 1B.

Resultados:

Dp4cycH4mT: Rendimento 64% (a partir de CS_2). Análise calculada. Para C_{19}
64.56; H, 6.56; N, 19.81%. Encontrada: C, 64.51; H, 6.47; N, 20.04%.

Dp4cycH4mT.HCl.5H_2O: Rendimento 87% (a partir de Dp4cycH4mT). Análise
Para $C_{19}H_{23}N_5S$.HCl 5.5H_2O: C, 47.54; H, 7.14; N, 14.59%. Encontrada: C, 47.0
N, 14.95%. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 8.82 (d, 1H), 8.61 (d, 1H), 8.04-7.90 (m, 3H)

376.3 (M + H, 5), 376 (M + Na, 34).

Dp4e4mT: Rendimento 44% (a partir de CS_2). Análise calculada. Para C_{15} 63.4; H, 5.7; N, 19.7%. Encontrada: C, 62.8; H, 5.9; N, 19.5%.

Dp4e4mT.HCl.5.5H_2O: Rendimento 91% (a partir de Dp4e4mT). Análise calcu $C_{15}H_{17}N_5S$.HCl 5.5H_2O: C, 41.42; H, 6.72; N, 16.10%. Encontrada: C, 41.31; 15.95%. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 8.84 (d, 1H), 8.66 (d, 1H), 8.13-8.09 (t, 1H), 8.0 2H), 7.67-7.59 (dt, 3H), 3.32 (s, 3H), 1.20 (s, 3H). MS *m/z* (%) 322.0 (M + Na, 4 (M; dímero, + Na, 100).

Exemplo 2 – Atividade Antiproliferativa de Dp4e4mT and Dp4cycH4mT

Metodologia:

Células de neuroepitelioma humano SK-N-M obtidas a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, US cultivadas de acordo com os métodos previamente descritos (Richardson, (1995). *Blood* 86: 4295-306). As células foram mantidas em meios essencia (MEM; *Invitrogen*, CA, EUA), que continham soro de bezerro fetal à 10 % *Biosciences*, Kansas, EUA), aminoácidos não essenciais à 1 % (*Gibco* Austrália), penicilina/estreptomicina/glutamina à 1 % (*Gibco*, VIC, Austrália) e (0,28 ng/mL; *Squibb Pharmaceuticals*, Montreal, Canadá).

As linhagens de células de câncer pancreático MIAPaCa-2, PANC 1, CAPAN-2 e CFPAC-1 foram um generoso presente Andrew Biankin (*Garvan Institute*, NSW, Austrália). As linhagens de células M PANC 1 e CFPAC-1 foram cultivadas em meio DMEM (*Invitrogen*) e as células foram cultivadas em meio de McCoy (*Invitrogen*). Todos os meios foram suple com soro de bezerro fetal à 10 % (v/v) (*Invitrogen*), aminoácidos não essenc (v/v) (*Invitrogen*), piruvato de sódio à 1 % (v/v) (*Invitrogen*), L-glutami (*Invitrogen*), 100 µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen*), 100 U/mL de penicilina (e 0,28 µg/mL de fungizona.

Resultados:

A capacidade dos compostos em inibir a proliferaç foi avaliada inicialmente em células SK-N-MC pelo ensaio MTT. Tanto Dp4e4m Dp4cycH4mT exibiram atividade antiproliferativa significativamente maior do q de DFO ($p < 0,05$) e do quelante de ferro 2-hidróxi-1-naftil-aldeído-isonicotinoil (***311***) ($p < 0,05$) em células SK-N-MC (Figura 2; Tabela 1), com valores de CI_{50} e de 0,013 µM, respectivamente.

Tabela 1. Atividade antiproliferativa de Dp4e4mT e Dp4cycH4mT contra neuro SK-N-MC.

Valores de CI_{50} (µM) do Dp4e4mT e do Dp4cyc

MTT. Células foram semeadas e deixadas se ligar às cavidades durante 2
então, incubadas durante 72 h à 37°C, com meio de controle ou os quelantes.
são média ± DP (3 experimentos).

	CI_{50} (μM)
DFO	13,4 ± 3,7
311	0,72 ± 0,32
Dp4mT	0,34 ± 0,11
Dp4m4eT	0,0041 ± 0,0015
Dp4cycH4mT	0,013 ± 0,0016

Os quelantes Dp4e4mT e Dp4cycH4mT são estr
relacionados ao composto di-2-piridil-cetona-4-metil-3-tio-semicarbazona
através da substituição de um átomo de hidrogênio no nitrogênio terminal (N4)
funcionais alquila. A formação de Dp4e4mT envolve a substituição de um
hidrogênio em N4 de Dp4mT com um grupo etila, enquanto que Dp4cycH4m
um substituinte de ciclo-hexila. Constatou-se que essas modificações
aumentam de maneira significativa ($p < 0,001$) a atividade antiproliferativa de
análogos em relação a Dp4mT, o qual tem um valor de CI_{50} de 0,34 μM (Figur
1).

Para se examinar adicionalmente o espectro d
antiproliferativa, Dp4cycH4mT foi testado contra câncer pancreático *in vitro*,
ensaios de proliferação MTT com células de câncer pancreático PANC 1, M
CFPAC-1 e CAPAN-2. Como uma comparação, tratamentos usados atualm
câncer pancreático, incluindo gemcitabina e 5-fluoro-uracila, também foram t
quelante de ferro, DFO, foi incluído como um controle positivo.

Em células MIAPaCa-2, PANC 1 e CAPAN-
elevada atividade antiproliferativa foi observada com Dp4cycH4mT (Figura 3
com valores de CI_{50} sendo significativamente ($p < 0,01$) mais baixos com
gemcitabina e à 5-fluoro-uracila (Tabela 2A). De fato, os valores de
Dp4cycH4mT eram pelo menos 100 vezes e 1.000 vezes mais baixos em 2
de células, quando comparados à gemcitabina e à 5-fluoro-uracila, respe
(Tabela 2A). O controle positivo, DFO, tinha atividade antiproliferativa rel
baixa.

Tabela 2A. Atividade antiproliferativa de Dp4cycH4mT contra linhagens de
câncer pancreático.

Valores de CI_{50} (μM) para crescimento e
antiproliferativa de Dp4cycH4mT em uma variedade de linhagens de células pa

uracila, conforme determinado pelo ensaio MTT. Células foram semeadas e
ligar às cavidades durante 24 horas e, então, incubadas durante 72 h à 37°C
de controle ou os quelantes. Resultados são média ± DP (3 experimentos).

	IC_{50} (μM)			
	DFO	**Dp4cycH4mT**	**Gemcitabina**	**5-Fluo**
MIAPaCa-2	38,7 ± 6,2	0,009 ± 0,0003	0,02 ± 0,005	24,
PANC 1	9,5 ± 1,4	0,05 ± 0,002	11,0 ± 0,8	62,
CAPAN-2	7,0 ± 5,4	0,04 ± 0,008	40,8 ± 4,7	59,2
CFPAC-1	14,7 ± 3,1	0,4 ± 0,2	0,02 ± 0,02	41,

Ao contrário dos outros tipos de células, em
semicarbazonas apresentaram a mais elevada atividade antiproliferativa,
CFPAC-1 foram as mais sensíveis à gemcitabina. De fato, o valor de
gemcitabina era significativamente ($p < 0,05$) mais baixo do que aquele de Dp
(Figura 3D e Tabela 2A). Dp4cycH4mT apresentou valores de CI_{90} mais bai
gemcitabina em células CFPAC-1 (Figura 3D, Tabela 2B). Portanto, es
sugerem que as tio-semicarbazonas apresentam o potencial para in
completamente a proliferação deste tipo de célula *in vitro*, quando usadas em
elevadas, enquanto que a atividade antiproliferativa de gemcitabina é ma
(Figura 3D), demonstrando a diferença em resposta dentre os diferentes tipos
Tabela 2B. Atividade antiproliferativa de Dp4cycH4mT contra linhagens de
câncer pancreático.

Valores de CI_{50} (μM) de Dp4cycH4mT em uma va
linhagens de células pancreáticas e em comparação a DFO e às drog
clinicamente, gemcitabina e 5-fluoro-uracila, conforme determinado pelo en
Células foram semeadas e deixadas se ligar às cavidades durante 24 hora
incubadas durante 72 h à 37°C, com meio de controle ou os quelantes. Resu
média ± DP (3 experimentos).

	IC_{90} (μM)			
	DFO	**Dp4cycH4mT**	**Gemcitabina**	**5-Fluo**
MIAPaCa-2	> 80	> 5	> 5	
PANC 1	> 80	> 5	> 5	>
CAPAN-2	> 80	> 5	> 5	>
CFPAC-1	> 80	5,4 ± 1,1	30,4 ± 2,2	>

Transferrina por Dp4e4mT and Dp4cycH4mT

Metodologia:

Ensaio de Efluxo de Ferro

O efeito dos quelantes de ferro Dp4e4mT e Dp
sobre a liberação de ^{59}Fe a partir de células de neuroepitelioma SK-N-MCs p
marcadas foram examinadas usando métodos estabelecidos (por exemplo, E
al. (1992). *Hepatology* 15: 492-501). Células SK-N-MC foram inicialmente plaq
sobre placas de cultura de 35 mm e incubadas à 37ºC em uma incubadora co
/ 95 % de ar umidificado até que elas estivessem aproximadamente 80 % c
Depois disso, as células foram previamente marcadas através de uma incul
horas à 37ºC com meios apropriados contendo 0,06 mg/mL de ^{59}Fe-Tf (prepa
destacado em Baker, E. *et al.* (1992). *Hepatology* 15: 492-501). As placas
foram, então, colocadas em gelo, o sobrenadante contendo excesso de
aspirado e as células foram lavadas 4 vezes com PBS gelado. As células fo
incubadas durante um adicional de 3 horas à 37ºC, com meios contendo quela
ou meios isoladamente (controle). Depois de 3 horas, as placas de cul
novamente colocadas sobre gelo, os meios foram coletados em tubos de conta
forneceu uma medição de ^{59}Fe liberado. PBS gelado (1 mL) foi adicionad
contendo células e as células foram raspadas a partir da superfície plástica u
espátula de Teflon e também coletadas em tubos de contagem. Esses tubos re
o teor de ^{59}Fe intracelular. Resultados são expressos como ^{59}Fe total liberado
percentagem de ^{59}Fe total. A radioatividade foi medida usando-se um *Wallac*
Gamma Counter (*PerkinElmer*, MA, EUA).

Ensaio de Assimilação de Ferro

O efeito dos quelantes de ferro Dp4e4mT e Dp
sobre a capacidade de SK-N-MCs manter ^{59}Fe a partir de meios foi examinada
métodos estabelecidos (Richardson, D R, *et al.* (1995). *Blood* 86: 4295-306; Ba
(1992). *Hepatology* 15: 492-501). As células foram cultivadas da mesma m
para os experimentos de efluxo de ferro. Uma vez que as células
aproximadamente 80 % confluentes, elas foram incubadas durante 3 horas à
meios contendo quelantes 25 µM ou meios isoladamente (controle). ^{59}Fe-Tf (0,
foi adicionado aos meios. No final da incubação, as placas de cultura foram
sobre gelo, os meios foram aspirados e as células foram lavadas 4 vezes
gelado. Solução de protease (1 mL; 1 mg/mL; *Sigma-Aldrich*, NSW, Au
adicionada a cada placa e deixada incubar sobre gelo durante 30 min. Isso
remoção de ^{59}Fe-Tf ligado à membrana. As células foram, então, raspadas
superfície plástica usando-se uma espátula de Teflon e em tubos de Eppend

então, transferido para tubos de contagem e o pélete de células foi ressuspen
antes de ser também transferido para outro conjunto de tubos de co
radioatividade foi medida usando-se um *Wallac Wizard 3" Gamma Counter* (P
MA, EUA). Os resultados são expressos como teor de ^{59}Fe médio da fração ce
uma percentagem do valor de controle.

Exemplo 3a – Efluxo de Fe Celular Mediado por Dp4e4mT and Dp4cycH4m

Todos os compostos de dipiridil-tio-semicarbazo
atividade de efluxo de ferro significativamente aumentada comparados às
controle ($p < 0,001$) (Figura 4A). As células de controle liberaram 7 % do ^{59}Fe
depois de uma reincubação durante 3 horas com meios frescos (Figura 4A). C
Dp4e4mT foi capaz de mobilizar 38 % de ^{59}Fe celular (Figura 4A), o qual foi
ao composto Dp4mT, que mobilizou 42 % do Fe celular. O composto Dp
mobilizou somente 22 % do ^{59}Fe celular, o que era similar ao quelante c
usado, DFO, que mobilizou 16 % de Fe celular, mas menos do que
estruturalmente relacionado Dp4mT (Figura 4A). Isso sugere que Dp4cycH
apresentar outros mecanismos de ação além da quelação de Fe conside
atividade antiproliferativa com relação ao DFO e Dp4mT (Tabela 1). O perfil c
ferro do composto 311 também foi examinado como um padrão interno e con
estudos prévios.

**Exemplo 3b – Inibição de Assimilação de ^{59}Fe Celular a partir de Transf
por Dp4e4mT e Dp4cycH4mT**

Para caracterizar adicionalmente a eficácia de c
Fe, a capacidade de Dp4e4mT e de Dp4cycH4mT em inibir a assimilação de ^{5}
de ^{59}Fe-Tf foi comparada ao composto estruturalmente relacionado, Dp4mT
limitou a assimilação de ^{59}Fe a 12 % do controle, que foi comparável a Dp4
limitou a assimilação de ^{59}Fe celular a 6 % do controle (Figura 4B). Dp4cy
menos eficaz do que ou Dp4e4mT ou Dp4mT, limitando a assimilação de ^{59}
(Figura 4B). No entanto, todos os compostos exibiram atividade consideravelm
do que DFO ($p < 0,001$), o que limitou a assimilação de ^{59}Fe a somente 84 % d
foi visto em células não tratadas (Figura 4B). Similarmente aos estudos de
ferro, o composto 311 também foi examinado como um padrão interno
assimilação de ^{59}Fe celular a 5 %, o que concordou com estudos prévios (po
Richardson, D R, *et al.* (1995). *Blood* 86: 4295-306).

**Exemplo 4 – Inibição *In Vivo* de Crescimento de Tumor por Dp
Dp4cych4mT**

Metodologia:

Camundongos nus fêmeas (BALB nu/nu), 8 se

Comitê de Ética Animal (Universidade de Sydney). Xenoenxertos de tumor es
por técnicas padrão (Whitnall, M, J. Howard, *et al.* (2006). *Proc Natl Acad Sc*
14901-6). Em estudos examinando o crescimento de carcinoma do pulmã
células crescendo exponencialmente foram coletadas e uma mistura 1:1
contendo células e Matrigel® (*BD Biosciences*, MA, EUA) foi preparada usand
células/100 µL. A mistura de células/matrigel foi injetada s.c. ao flanco
camundongos anestesiados com metóxi-fluorano. Em estudos examinando o
de células de câncer pancreático, cada camundongo foi injetado subcutaneam
x 10^6 células PANC 1 suspensas em Matrigel (*BD Biosciences*, San Jose, C
tamanho de tumor foi medido por calibres Vernier e o volume de tumor fo
conforme previamente descrito (Balsari, A., M. Tortoreto, *et al.* (2004). *Eur J*
1275-81). Uma vez que os tumores alcançaram uma média de 90 mm^3, o
começou (Dia 0; Figura 5).

Dp44mT e Dp4cycH4mT.HCl foram disso
propileno glicol à 30 % em salina à 0,9 % e injetados intraperitonealmente
caudal) 5 dias/semana ou dados por tubo de ingestão oral 5 dias/semana n
especificada no respectivo estudo.

No estudo com PANC 1, gemcitabina foi dis
propileno glicol à 15 % em salina à 0,9 % e foi injetada intraperitonealme
terceiro dia e cada grupo (n = 8) receberam ou gemcitabina (5 mg/Kg), Dp
mg/Kg), Dp4cycH4mT.HCl (5 mg/Kg) ou controle de veículo. No estudo com
controle de veículo foi subdividido em dois grupos (n = 4) com um recebendo u
intravenosa de propileno glicol a 30 % em salina à 0,9 % 5 dias/semana, que a
um controle para o grupo de tratamento com quelante de ferro. O outro gru
propileno glicol à 15 % em salina à 0,9 % intraperitonealmente a cada terceiro
controle apropriado para o tratamento com gemcitabina. Uma vez que os t
controle alcançaram 1.000 mm^3, os animais foram submetidos à eutanási
exigências éticas.

Hematologia, Bioquímica e Histologia:

Quando se completou o experimento *in vivo*, o
coletado por punção cardíaca e os índices hematológicos foram ensaiados p
padrão (Dunn, L.L, *et al.* (2006) *Carcinogenesis* 27: 2157-69). Tecidos incluind
tumores, foram embutidos em blocos de parafina e seccionados. Foram util
tingimentos diferentes, a saber: hematoxilina e eosina (H & E), corante d
corante Gomori-Tricromo. No estudo com xenoenxerto de tumor PANC 1,
histológica e a quantificação de características patológicas foram realizad
patologista veterinário independente (Dr Terrence Rothwell, *Rothwell Consult*

Análise Estatística:

Os dados foram comparados por uso de teste *t*

Os resultados foram expressos como média ± EPM a menos se indicad maneira. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando

Exemplo 4a – Efeito de Dp4e4mT.HCl por Administração i.v. sobre a Inibi de Carcinoma do Pulmão Humano DMS-53

Uma potente resposta a Dp4e4mT.HCl foi ob modelo de xenoenxerto de DMS-53 em camundongos nus (Figura 5). Depois o tamanho de tumor líquido médio em camundongos tratados com veículo de 780 % do volume de tumor inicial, enquanto que nos camundongos tratados mg/Kg de Dp4e4mT, o tamanho de tumor líquido era 120-122 % do volume era comparável ao grau de inibição de tumor exibido por 0,75 mg/Kg Dp44mT o crescimento do tumor para 122 % do volume de tumor inicial (Figura 5).

Exemplo 4a(i) – Avaliação Biológica Seguindo o Tratamento *com* Dp4 Análises de Perda de Peso e Hematológica em Camundongos Portando do Pulmão Humano DMS-53

No estudo com carcinoma do pulmão camundongos tratados *i.v.* com 0.75 mg/Kg Dp44mT perderam 9 % de (Tabela 3). Ao contrário, camundongos tratados com Dp4e4mT.HCl em 4 experimentaram perda de peso de 0,6 % e de 7 % de peso do co respectivamente, (Tabela 3) depois de 25 dias de tratamento. Camundongos neste experimento, perderam 6 % de peso do corpo inicial (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento de carcinoma do pulmão DMS-53 em estudo de admin de Dp4e4mT em camundongos nus: Pesos do corpo e de órgãos (g).

	Grupos Experimentais (n = 6)				
Órgão	**Controle**	**Dp4e4mT-HCl (6 mg/Kg)**	**Dp4e4mT-HCl (4 mg/Kg)**	**Dp4e4mT-HCl (1,5 mg/Kg)**	**(0**
Perda de peso inicial (% peso inicial)	95,45 ± 3,41	93,38 ± 3,96	99,41 ± 1,75	95,14 ± 0,97	
Fígado	1,05 ± 0,13	1,1 ± 0,08	1,03 ± 0,02	1,01 ± 0,02	
Baço	0,13 ± 0,02	0,089 ± 0,01	0,08 ± 0,003	0,11 ± 0,01	
Rim	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	
Coração	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,004	
Cérebro	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,26 ± 0,13	
Tumor	0,97 ± 0,08	0,04 ± 0,03**	0,11 ± 0,09***	0,48 ± 0,6*	

Em termos de hematologia, depois de 2 se
tratamento com Dp44mT em 0,75 mg/Kg ou com Dp4e4mT.HCl em 1,5, 4 o
não houve mudança significativa na contagem de células vermelhas do s
hemoglobina ou na contagem de células brancas do sangue (Tabela 4). Isso
em nas doses e no programa de administração usados, Dp4e4mT.HCl foi bem

Tabela 4. Crescimento de carcinoma do pulmão DMS-53 em estudo de admin
de Dp4e4mT em camundongos nus: Hematologia.

Controles	*CBS (10^9 células/L)*	*CVS (10^{12} células /L)*	*HGB (g/L)*	*HCT*	*(1*
DP	2,77	10,03	144,67	0,44	
Média Dp4e4mT.HCl (1,5 mg)	0,57	0,13	8,5	0,03	
DP	3,34	8,76	150,60	0,4	
Média Dp4e4mT.HCl (4 mg)	1,12	3,31	7,99	0,14	
DP	2,94	10,74	153,75	0,47	
Média Dp4e4mT.HCl (6 mg)	0,56	0,33	4,92	0,01	
DP	4,63	9,33	132,33	0,41	
Média Dp44mT (0,75 mg)	2,46	1,01	16,26	0,05	
DP	5,38	9,87	135,50	0,43	
Média	1,46	0,83	10,61	0,01	

CBS – células brancas do sangue; CVS – células vermelhas do sangue; HGB – hemoglo
hematócrito; PLT - plaquetas

Exemplo 4a(ii) – Efeitos de Dp4e4mT sobre a Histologia de Tecidos
Tratamento *i.v.* com Dp4e4mT em Camundongos Portando Carcinoma
Humano DMS-53

A avaliação histológica foi realizada em tecidos
experimento com carcinoma do pulmão humano DMS-53 *i.v.* Os resu
discutidos comparando-se tecidos a partir de camundongos xenoenxertados
53 tratados com veículo, Dp44mT (2 semanas em 0,75 mg/Kg) ou Dp4e4

E), nenhuma diferença significativa foi encontrada na histologia do fígado, cérebro ou tumor a partir de camundongos tratados com controle e quelante.

No entanto, lesões do miocárdio foram obse camundongos tratados com Dp44mT (0,75mg/Kg; Figura 6). Tais lesões cons focos pobremente diferenciados de necrose, sendo substituídos por tec imaturo, o qual era evidente usando-se tingimento com Gomori-Tricromo (seta e era consistente com aqueles descritos previamente para Dp44mT (Whit Howard, *et al.* (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14901-6). No entanto, Dp não induziu lesões no miocárdio em 4 mg/Kg ou 6 mg/Kg depois de 2 s administração i.v. (Figura 6).

Exemplo 4b – Efeito de Dp4e4mT.HCl por Administração Oral sobre a *Vivo* de Carcinoma do Pulmão Humano DMS-53

Similarmente àquilo que foi encontrado Dp4e4mT.HCl foi dado por administração *i.v.* (Figura 5), foi observada ur resposta a Dp4e4mT.HCl por tubo de ingestão oral, em camundongos nus xenoenxerto de DMS-53 (Figura 7A). Depois de 21 dias, o tamanho de tu médio em camundongos tratados com veículo de controle era 1.124 % do tumor inicial, enquanto que, em camundongos tratados com 7,5 ou 10 Dp4e4mT, o tamanho de tumor líquido era 404 % e 284 % do volume de tu respectivamente (Figura 7A). Doses mais baixas de Dp4e4mT.HCl (2,5 e também limitaram o crescimento de tumor em 645 % e 733 % dos volum respectivamente (Figura 7A).

Considerando o peso do tumor, no final do tratamento de 21 dias, camundongos de controle não tratados, tinham tu pesavam, em média, 1,8 g (Figura 7B). Camundongos tratados com Dp4e4m 10 mg/Kg por tubo de ingestão oral, exibiram uma diminuição potente e signif 0,0002) no peso de tumor médio para 0,46 g (Figura 7B). Doses mais Dp4e4mT.HCl por tubo de ingestão oral também inibira, de maneira significati de tumor (Figure 7B). Por exemplo, a mais baixa dose administrada, 2,5 mg/K em uma redução significativa ($p < 0,002$) no peso de tumor médio para 0,63 7B).

Exemplo 4b(i) – Avaliação Biológica Seguindo o Tratamento Oral Dp4e4mT: Análises de Perda de Peso e Hematológica em Camundongos Carcinoma do Pulmão Humano DMS-53

No estudo com carcinoma do pulmão camundongos tratados oralmente com Dp4e4mT.HCl, nenhum grupo de exibiu qualquer perda de peso significativa em comparação ao grupo de contro

enquanto que camundongos tratados com a dose mais elevada de Dp4e4 mg/Kg) retiveram 94 % de seu peso inicial, indicando que o tratamento nes bem tolerado (Tabela 5).

Tabela 5. Crescimento de carcinoma do pulmão DMS-53 em estudo de ad oral de Dp4e4mT em camundongos nus: Pesos do corpo e de órgãos (g).

	Grupos Experimentais			
Órgão	Controle (n = 11)	Dp4e4mT (2,5 mg/Kg) (n=8)	Dp4e4mT (5 mg/Kg) (n=10)	Dp4e4mT (7,5 mg/Kg) (n=9)
Peso corpo (% inicial)	96,3 ± 1,7	94,1 ± 1,3	91,6 ± 2,4	91,6 ± 2,2
Fígado	0,84 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,83 ± 0,03
Baço	0,082 ± 0,003	0,075 ± 0,004	0,075 ± 0,004	0,061 ± 0,009
Rim	0,205 ± 0,003	0,194 ± 0,005	0,187 ± 0,006	0,193 ± 0,008
Coração	0,083 ± 0,002	0,078 ± 0,002	0,078 ± 0,002	0,092 ± 0,005
Cérebro	0,367 ± 0,007	0,372 ± 0,006	0,367 ± 0,007	0,356 ± 0,007
Pulmão	0,115 ± 0,003	0,121 ± 0,005	0,117 ± 0,003	0,119 ± 0,004
Tumor	1,76 ± 0,24	0,63 ± 0,17**	0,89 ± 0,14**	0,60 ± 0,15**

Valores expressos como média ± EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ comparados ao contro conforme determinado pelo teste T de Student.

Em termos de hematologia, depois de 21 dias de com Dp4e4mT.HCl em 2,5, 5, 7,5 ou 10 mg/Kg, houve mudanças signif contagem de células vermelhas do sangue, em hematócrito ou na contagem brancas do sangue (Tabela 6). Embora em 5 mg/Kg, Dp4e4mT.HCl reduziu significativa ($p < 0,05$) as células brancas do sangue, e, em 10 mg/Kg reduziu significativa ($p < 0,05$) a hemoglobina, em comparação aos animais não tr entanto, o significado clínico destas mudanças não está claro. Globa hematologia indicou que as doses e o programa de administração qu Dp4e4mT.HCl foram bem tolerados.

A análise bioquímica do soro mostrou que o trata Dp4e4mT.HCl em 5 mg/Kg diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a "capa ligação de ferro total" (CLFT) em relação ao controle (53,1 ± 1,2 em relação µmoles/L, respectivamente; Tabela 6). No entanto, grupos de tratamento com mais elevadas não exibiram supressão de CLFT (Tabela 6). Adiciona "capacidade de ligação de ferro insaturada" (CLFI) foi aumentada de maneira s ($p < 0,01$) no grupo de tratamento com 5 e 7,5 mg/Kg de Dp4e4mT.HCl, em r controles não tratados, mas o grupo de tratamento com 10 mg/Kg não exibi mudança significativa (Tabela 6). A fosfatase alcalina estava também elevada

comparados aos controles não tratados (89,5 ± 4,5 em relação a 68
respectivamente; Tabela 6) e também estava elevada de maneira significativa
de 2,5 e de 7,5 mg/Kg (Tabela 6).

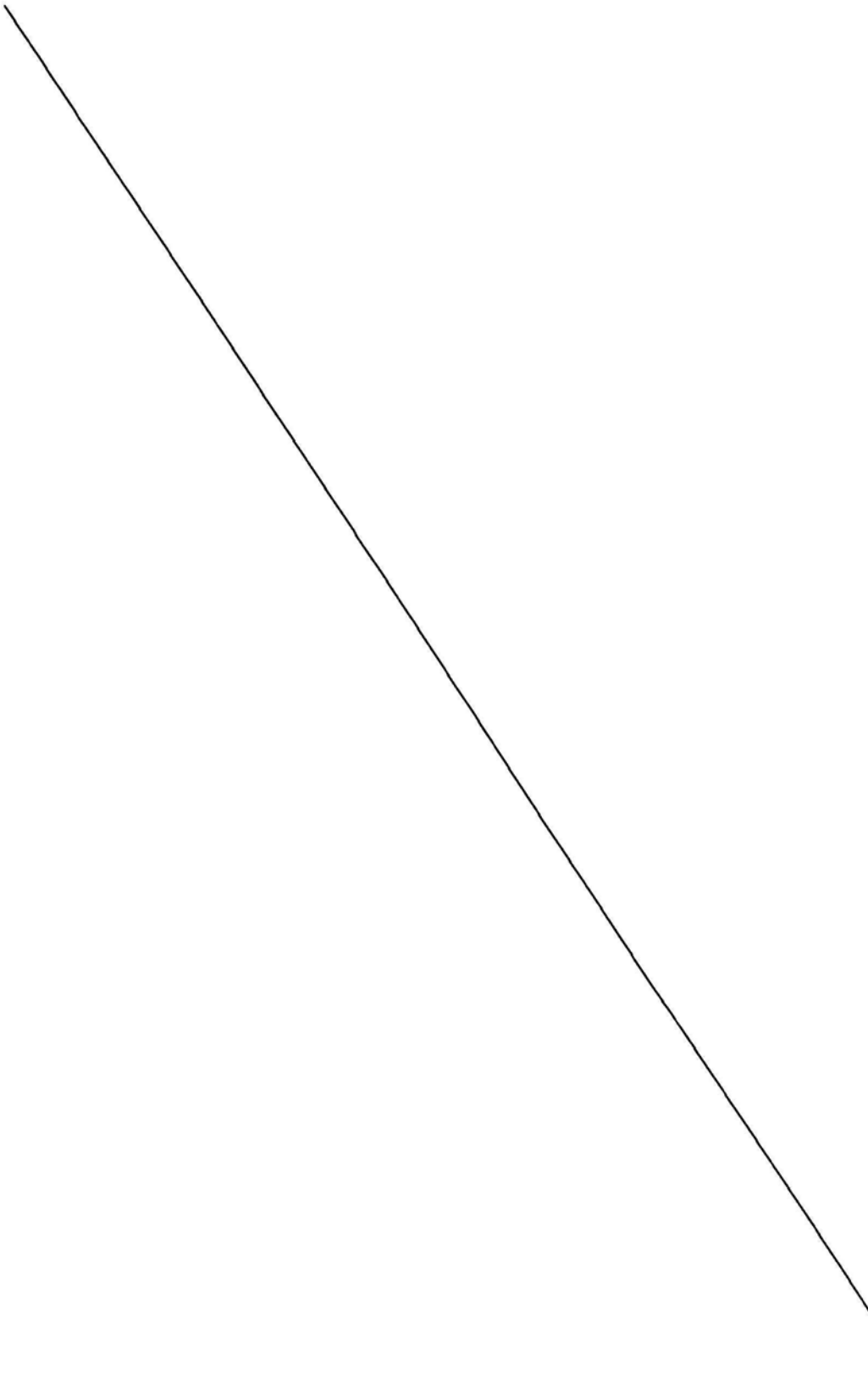


Tabela 6. Hematologia de bioquímica

Índices	Unidades	Grupos de Tratamento (Tubo de Ingestão Oral durante 21 dias, 3 dias/semana)				
		Controle Veículo (n = 11)	Dp4e4mT 2,5 mg/Kg (n = 8)	Dp4e4mT 5 mg/Kg (n = 10)	Dp4e4mT 7,5 mg/Kg (n = 9)	Dp4e4mT 10 mg/Kg (n = 9)
Índices Hematológicos						
Células vermelhas do sangue (CVS)	10^{12}/L	10,92 ± 0,10	10,55 ± 0,12	10,26 ± 0,17	10,85 ± 0,14	10,18 ± 0,30
Células brancas do sangue (CBS)	10^{9}/L	2,62 ± 0,20	2,68 ± 0,53	1,80 ± 0,15*	3,08 ± 0,43	3,27 ± 0,36
Hemoglobina (HGB)	g/L	156 ± 1	148 ± 2	143 ± 2	151 ± 2	142 ± 5*
Hematócrito (HCT)	%	0,46 ± 0,004	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01
Plaquetas	10^{9}/L	936 ± 79	1.047 ± 73	973 ± 49	834 ± 114	917 ± 142
Índices Bioquímicos do Soro						
Ferro sérico	µmoles/L	26,8 ± 2,1	25,5 ± 2,0	31,0 ± 1,9	32,8 ± 2,3	21,2 ± 2,0
Capacidade de ligação de ferro total (CLFT)	µmoles/L	60,7 ± 2,0	56,7 ± 2,1	53,1 ± 1,2**	56,8 ± 0,9	60,2 ± 2,3
Capacidade de ligação de ferro insaturada (CLFI)	µmoles/L	55,1 ± 2,5	57,9 ± 3,5	66,9 ± 2,3**	64,9 ±2,0**	50,1 ± 2,7
Fosfatase alcalina (FAL)	U/L	67,7 ± 5,7	85,7 ± 5,0*	61,7 ± 2,0	87,2 ± 4,1*	89,5 ± 4,5**
Alanina aminotransferase (ALT)	U/L	68,7 ± 12,8	73,1 ± 14,4	44,9 ± 2,8	57,2 ± 12,9	63,4 ± 9,9
Albumina	g/L	32,7 ± 0,6	31,3 ± 0,9	30,4 ± 0,5*	31,3 ± 1,1	29,3 ± 1,6
Colesterol	mmoles/L	2,79 ± 0,19	2,44 ± 0,23	2,63 ± 0,12	2,78 ± 0,24	2,46 ± 0,16
Triglicerídeos	mmoles/L	0,85 ± 0,12	1,00 ± 0,25	0,57 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,94 ± 0,08

Valores expressos como média EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ comparados ao respectivo controle de veículo,

Exemplo 4b(ii) – Efeitos de Dp4e4mT em Histologia de Tecidos Tratamento com Dp4e4mT Oral em Camundongos Portando Carcinoma Humano DMS-53

A avaliação histológica foi realizada em tecidos experimento com carcinoma do pulmão humano DMS-53. Os resultados sã comparando-se tecidos a partir de camundongos xenoenxertados com DMS- com veículo, Dp44mT (2 semanas em 0,75 mg/Kg) ou Dp4e4mT.HCl (3 sema 5; 7,5 e 10 mg/Kg). Em seções tingidas com hematoxilina e eosina (H & E diferença significativa foi encontrada na histologia do fígado, baço, rim, céreb a partir de camundongos de controle e tratados com tio-semicarbazona (Figur

Entretanto, lesões do miocárdio foram obse camundongos tratados com Dp44mT (0,75mg/Kg; Figura 8). Tais lesões con focos de necrose pobremente diferenciados, sendo substituídos por tec imaturo, o qual foi evidenciado usando corante Gomori-Tricromo (seta; Fig entanto, Dp4e4mT.HCl não induziu lesões do miocárdio depois de 3 semanas 7,5 e 10 mg/Kg de administração oral (Figura 8).

Exemplo 4c – Efeito de Dp4cycH4mT.HCl por Administração i.v. na Inibi de Carcinoma Pancreático Humano PANC 1

A análise *in vitro* demonstrou que as tio-semi Dp44mT e Dp4cycH4mT.HCl são consideravelmente mais eficazes e proliferação de uma gama de linhagens de células de câncer pancreáti comparadas à gemcitabina (Figuras 3A-C, Tabelas 2A e B). Foram realizad para caracterizar adicionalmente a eficácia das tio-semicarbazonas cor pancreático *in vivo*.

Usando-se xenoenxertos de PANC 1, depois de de tratamento, os camundongos de controle de veículo atingiram um tamanh médio de aproximadamente 640 % do volume de tumor inicial, enquanto que tratados com gemcitabina, Dp44mT e Dp4cycH4mT.HCl atingiram uma média 305 % e 112 % do tamanho de tumor original, respectivamente (Figura 9A). G ($p < 0,01$), Dp44mT ($p < 0,05$) e Dp4cycH4mT.HCl ($p < 0,001$) todos re maneira significativa o volume de tumor, em relação ao controle, depois de tratamento.

Além disso, os pesos de tumor finais depois de tratamento refletiram os volumes de tumor, com tumores de controle pesando de 292 ± 65 mg, enquanto que os tumores tratados com gemcitabina, Dp4cycH4mT.HCl pesarem uma média de 67 ± 25 mg, 122 ± 33 mg e 40

vivo.

Embora a diferença entre volumes de Dp4cycH4mT.HCl e gemcitabina não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$ obtidos indicam que, depois do dia 32, os tratamentos tanto com gemcitabina Dp44mT foram levemente menos eficazes em inibir o crescimento de tum comparados àquele com Dp4cycH4mT.HCl (Figura 9A). Como o tamanho d grupo de controle de veículo era o fator limitante na duração deste experime possível continuar adicionalmente o tratamento depois de 43 dias, devido a éticas.

Exemplo 4c(i) – Avaliação Biológica Seguindo o Tratamento Dp4cycH4mT.HCl: Análises de Perda de Peso e Hematológica em Cam Portando Carcinoma Pancreático Humano PANC 1

Para determinar se os diferentes agentes u estudos *in vivo* acima estavam associados com qualquer toxicidad hematológicos, assim como os pesos do corpo e dos órgãos foram analisados eutanásia.

Tabela 7A. Crescimento de carcinoma pancreática PANC-1 em estudo de ad i.v. de Dp4cycH4mT em camundongos nus: Pesos do Corpo e de Órgãos (g).

Órgão	*Grupo Experimental (n = 8)*		
	Controle	**Dp4cycH4mT (5 mg/Kg/dia)**	**Gemcital (5 mg/Kg**
Perda peso corpo (% peso inicial)	104,9 ± 4,6	88,0 ± 6,5***	104,5 ±
Fígado	0,96 ± 0,11	0,80 ± 0,03	1,04 ± 0
Baço	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,01**	0,13 ± 0
Rim	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0
Coração	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0
Cérebro	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0
Tumor	0,29 ± 0,07	0,04 ± 0,01***	0,07 ± 0,(

$p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

O peso do corpo dos animais depois de 6 se tratamento permaneceu próximo a 100 % do peso de pré-tratamento para c com exceção de Dp4cycH4mT.HCl (Tabela 7A). Esses animais exibiram um peso significativa ($p < 0,001$) de 12 %, quando comparada a seu peso de pré (Tabela 7A). Embora nenhuma diferença nos pesos dos órgãos fosse encontra

Dp4cycH4mT.HCl também tinha um baço significativamente ($p < 0,001$) me
comparado ao grupo de controle (Tabela 7A). Uma análise histológica do baç
que a polpa vermelha esplênica de camundongos, em todos os grupos, co
população normal de células hematopoiéticas. Portanto, não houve exigênc
toxicidade esplênica (Figura 10).

Tabela 7B. Crescimento de carcinoma pancreático PANC 1 em estudo de ac
i.v. de Dp4cycH4mT i.v. em camundongos nus: Hematologia.

	Grupos Experimentais (n=8)		
	Controle	**Dp4cycH4mT (5 mg/Kg/dia)**	**Gem (5 mg**
CVS x 10^{12}/L	10,17 ± 0,15	9,46 ± 0,31	9,65
Hb g/L	146,44 ± 1,68	131,88 ± 4,31**	147,8
HCT	0,44 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,45
Plaquetas 10^9/L	1042 ± 147	1283 ± 160	106
CBS x 10^9/L	4,53 ± 0,44	3,5 ± 0,34	5,51
Reticulócitos x 10^{12}/L	0,56 ± 0,06	0,77 ± 0,08*	0,35

$p<0,05$, ** $p<0,01$

Índices hematológicos, em particular, sinais
eram um importante parâmetro para examinar como os compostos de tio-sem
são quelantes de ferro. Nenhuma diferença significativa nas contagens
vermelhas do sangue (CVS), de células brancas do sangue (CBS) ou de p
detectada entre o grupo de controle e os diferentes grupos de tratamento (Tab
entanto, os grupos de Dp44mT e de Dp4cycH4mT.HCl apresenta
significativamente ($p < 0,01$) mais baixos de hemoglobina (Hb) e significativa
0,05) mais elevados de reticulócitos, quando comparados ao grupo de contr
7B). Isso pode ser um indicador de uma leve anemia nesses animais.

Exemplo 4c(ii) – Efeitos sobre a Histologia de Tecido Seguindo o Tratar
Dp4cycH4mT.HCl Oral em Camundongos Portando Carcinoma P
Humano PANC 1

Para investigar adicionalmente os efeitos tóxicos
dos diferentes tratamentos sobre os órgãos, foi realizada uma análise his
baço, rim, fígado, coração, pulmões, cérebro e medula óssea, por tingimento
(para patologia geral), corante de Pearl (para presença de ferro) e corante
Tricromo (para fibrose). A análise histológica foi realizada por um patologista v
os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Avaliação Histopatológica Independente

Grupo Tratamento	MEDULA	RIM	FÍGADO	PULMÃO	MIOCÁRDIO	
	HP	Fe	HP	HP	HP	Fibrosis
Controle	N	+	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	+	N	N	N	-
	N	++	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	+/-	N	-
	N	-	N	+	N	-
	N	+/-	N	N	N	-
	N	+	N	N	N	-
Gemcitabina	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
	N	-	N	N	N	-
Dp44mT	N	++	N	N	++	++
	N	+	N	N	+	+
	N	++	N	+/-	+	+
	N	+	+	N	+	+
	N	+	++	+	+	+
	N	+	+/-	+/-	+	+
	N	+	++	N	+	+
	N	+/-	+/-	+	+	+
Dp4cycH4mT.HCl	N	+	N	N	N	-
	N	+	N	+/-	N	-
	N	+	+/-	N	N	-
	N	+	+/-	N	N	-
	N	+	+/-	N	N	-
	N	+	N	+	N	-
	N	+	N	N	N	-
	N	+	N	N	N	-

HP – Mudanças histopatológicas; Fe – Classificação para presença de ferro tingido por corante
HPC – Classificação para a presença de células hematopoiéticas na polpa vermelha esplênica;
N – Nenhuma mudanças histopatológica detectada.
(-) Nenhum dado; (+/-) Lesão muito suave, localizada; (+) Menos do que 10 % de lesão; (++) Me
20 % de lesão.

Dois camundongos tratados com Dp44mT
alguma evidência de células hematopoiéticas no fígado. Em adição, depósit
foram observados nos rins de 5 dos 10 camundongos tratados com controle
animais tratados com Dp44mT e Dp4cycH4mT.HCl (Tabela 8), o que pode s
ferro na dieta e a excreção do complexo de ferro formado pelos quelan
semicarbazona na urina, respectivamente. O grupo tratado com gemcitabina

grupo de Dp44mT exibiu lesões do miocárdio, que foram caracterizadas por d
e necrose de fibras do miocárdio, com substituição por tecido fibroso. (Figura
8). As mudanças patológicas observadas foram muitíssimo pronunciadas na
ventrículo direito e também no miocárdio subjacente ao endocárdio do
esquerdo (Figura 10). Isto está de acordo com um estudo prévio, que tambe
cárdio-fibrose em camundongos nus tratados com Dp44mT. Não houve
significativa de lesões fibróticas no coração do grupo tratado com Dp4cyc
demonstrando que este composto era mais potente e de longe menos tóx
Dp44mT *in vivo*, em doses mais elevadas.

De maneira significativa, não houve evidência d
em qualquer dos outros órgãos examinados (Tabela 8), sugerindo
Dp4cycH4mT.HCl, nem gemcitabina induziram lesão de tecido marcan
comparados aos controles não tratados.

Exemplo 4d: Efeito de Dp4cycH4mT na Expressão da Proteína de Su
Metástase NDRG-1, Receptor de Transferrina e Moléculas de Control
Celular

Metodologia:

Análise western blot

O isolamento da proteína foi realizado confor
previamente (Dunn, L.L., *et al.* (2006) *Carcinogenesis* 27: 2157-69).

A análise *western* foi realizada via protocolos es
(Gao, J. e D. R. Richardson (2001). *Blood* 98: 842-50). Os anticorpos primá
eram contra NDRG1 (*Abcam*; RU), p21, ciclina D1, receptor 1 de transfe
Santa Cruz, CA, EUA) e β-actina (*Sigma-Aldrich*), com anticorpos de c
camundongo conjugados a HRP secundários (*Sigma-Aldrich*).

Resultados:

Dp4cycH4mT foi examinado para determinar se
regular à montante a expressão de NDRG-1. Para avaliar adicionalmente
quelante Dp4cycH4mT sobre outras moléculas chave envolvidas na progress
celular, foi examinada a expressão do inibidor de quinase dependente de c
assim como da ciclina D1, em células MIAPaCa-2. Como um controle posi
tratamento com quelante de ferro, o receptor 1 de transferrina (TfR1) f
examinado, uma vez foi previamente constatado que esta proteína é regulada
por compostos de tio-semicarbazona.

Tanto Dp44mT quanto Dp4cycH4mT regularam a
de maneira significativa ($p < 0,01$), a expressão de NDRG1 em células M
enquanto que a gemcitabina não apresentou efeito marcante (Figura 11).

de ciclina D1, embora aumentando marcadamente ($p < 0,05$) a expressão de
células (Figure 11). Além disso, os níveis de TfR1 também foram regulados
de maneira significativa ($p < 0,05$), nas células MIAPaCa-2, seguindo o trata
os compostos de tio-semicarbazona, sugerindo que estes agentes estava e
esvaziando as células de ferro (Figura 11). Por outro lado, o tratamento com
não modulou os níveis de ciclina D1, p21 ou TfR1 nas células MIAPaCa-2
indicando que seu mecanismo de ação é diferente daquele das tio-semicarbaz

Coletivamente, esses resultados mostram que
marcadamente regulada à montante por Dp4cycH4mT, sugerindo que Dp4cyc
ser uma estratégia de tratamento benéfica contra cânceres tendo-se p
expressão de NDRG1 em células de câncer.

Exemplo 5 : Modulação *In Vitro* e *In Vivo* dos Níveis de Met-Hemoglobina de Metmioglobina (metMb) por Quelantes de Ferro

Metodologia

Entes Químicos

Triapine® foi sintetizada e caracterizada de a
métodos publicados (Liu MC, Lin TC, *et al.* (1992). *J Med Chem* 35:
Dp44mT, Bp4eT, DpC, di-2-piridil-cetona-4-etil-4-metil-3-tio-semicarbazona
di-2-piridil-cetona-4-fenil-3-tio-semicarbazona (Dp4pT) e di-2-piridil-cetona-2
semicarbazona (Dp2mT) também foram sintetizadas e caracterizadas
procedimentos publicados (Richardson DR, Sharpe PC, *et al.* (2006). *J Med*
6510-6521; Kalinowski DS, Yu Y, *et al.*, (2007). *J Med Chem* 50: 3716-3729
outros entes químicos foram adquiridos a partir de *Sigma-Aldrich* (St. Louis,
Para uso nos ensaios descritos abaixo, os compostos foram recém-prep
DMSO e diluídos ([DMSO] final < 0,05%).

Isolamento das células vermelhas do sangue

Amostras de sangue integral foram coletadas
doadores humanos saudáveis ou de camundongos, em tubos de coleta
adequados contendo EDTA, e usadas imediatamente. Células vermelhas
(CVS) foram isoladas por centrifugação (480 x *g* / 5 min / 4ºC), então lavadas
de sal balanceada de Hank (HBSS). As CVS foram novamente suspensas n
1:1 em HBSS e os ensaios com CVS integrais foram realizados à 37ºC.

Preparação de Mioglobina

Tecido de coração de camundongo foi exau
perfundido com HBSS gelado para remover sangue e homogeneizado em HE
contendo coquetel inibidor de protease (*Roche*, Basiléia, Suíça). Os homoge
coração foram centrifugados (16.000 x *g* / 45 min / 4ºC) e o sobrenadante (f

Medição de metHb e de metMb por Espectrofotometria UV-Vis

Os níveis de metHb e de metMb em lisados de
determinados usando-se um espectrofotômetro UV-Vis *Shimadzu* (UV-1800
Corporation, Kioto, Japão) à 577 nm e 630 nm para metHb e metMb, de a
métodos publicados (Winterbourn CC e Carrell RW (1977). *Biochem J* 165: 14

Formação de metHB e de metMb em camundongos

Camundongos C57BL/6 (7-8 semanas de ida
usados sob um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Unive
Sydney. Dp44mT, Triapine® ou Dp4cycH4mT (todos em 6 mg/Kg) foram diss
propileno glicol à 30 % / salina e administrados i.v. via a veia caudal. Subsequ
30 minutos depois da administração, os camundongos foram anestes
isoflurano e amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca. As a
sangue foram lisadas com 2,5 volumes de água ultrapura para estimativa de
camundongos foram sacrificados com isoflurano, o coração foi exau
perfundido com HBSS e a Mb isolada.

Estatística

Os dados foram comparados usando-se o
Student. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os
são média ± DP.

Exemplo 5a – Capacidade de Quelantes de Ferro Induzirem a Formação em CVSs Humanas

Foi avaliado o efeito da concentração de quelante
na geração de metHb com CVSs intactas (Figura 12). O aumento dependen
significativo ($p < 0,001$) em metHb, em relação ao controle, foi detectado em
concentrações de ligante em CVSs intactas tratadas com Triapine® ou Dp44mT
3 h / 37ºC (Figura 12), que foram os únicos quelantes a demonstrar uma cap
induzir a formação de metHb. Em 25 µM, esses quelantes aumentaram a fo
metHb para 19,95 ± 1,0 e 19,9 ± 3,0 % de Hb total, Respectivamente (Fig
quelante de controle negativo Dp2mT, por projeto, apresenta um grupo
impede a formação de complexo. Consequentemente, esse quelante não pod
na interação redox com o ferro, que dá origem à formação de metHb (
Adicionalmente, o quelante ativo não redox, DFO, atualmente usado como um
para distúrbios de sobrecarga de ferro, também não aumentou a formação de m

De maneira significativa, Dp4cycH4mT não pote
formação de metHb *in vitro* (Figura 12). Isso pode constituir uma clara va
terapia com DpcycH4mT em relação àquela com Triapine®.

Exemplo 5b – Capacidade dos Quelantes de Ferro Triapine, Dp44mT e Dp

Para confirmar os resultados *in vitro* do E
mostrando que Dp4cycH4mT não potencializou a formação de metHb, foi e
formação de metHb em um modelo com camundongo, conforme descrito acim

A camundongos C57BL/6 foram administrados
mg/Kg), Triapine® (6 mg/Kg) ou Dp4cycH4mT (6 mg/Kg), intravenosamente,
se o sangue depois de 30 minutos, para avaliar metHb (Figura 13). Confor
previamente, Dp44mT induziu, de maneira significativa (p < 0,001), os nívei
em relação ao veículo (6,3 ± 0,8 comparado a 1,3 ± 0,9 % de % de metHb %
respectivamente), enquanto que os níveis de metHb induzidos por Dp4cycl
comparáveis ao controle (Figura 13).

Esse resultado com Dp4cycH4mT confirmou os
dos estudos *in vitro* no Exemplo 5a e adicionalmente sugere que Dp4cycl
apresentar a vantagem específica de não induzir metHb comparado a Dp44m

Exemplo 5c – Capacidade do Quelantes de Ferro Triapine, Dp44mT e Dp
em Induzir a Formação de metMioglobina (metMb) *In Vivo*

A proteína mioglobina (Mb) desempenha um
papel no armazenamento nos e na doação de oxigênio aos músculos e uma
monomérica da hemoglobina. Consequentemente, foi avaliado o efeito de
ativos anticâncer potentes sobre a formação de metMb *in vivo*. A camundongo
foram administrados Dp44mT (6 mg/Kg), Triapine® (6 mg/Kg) ou Dp4cycH4m
intravenosamente, e amostrou-se o sangue depois de 30 minutos para ava
(Figura 14).

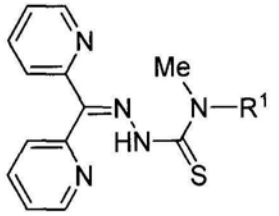
O quelante Dp44mT induziu, de maneira signif
0,001), os níveis de metMb (82,3 ± 2,6 %), que eram similares àqueles d
(75,2 ± 4,2 %), enquanto que Dp4cycH4mT gerou níveis significativamente
mais baixos de metMb (31,7 ± 3,2%; Figura 14).

No entanto, níveis mediados por Dp4cycH4mT
eram significativamente (p < 0,001) mais elevados do que o controle (12,6 ± 2,
14).

Coletivamente, as propriedades de Dp4cycl
termos de ser significativamente menos eficaz em induzir a formação de m
metMb, embora mantendo a atividade antitumor (Kovacevic Z, Chikhani S, *et*
Mol Pharm 80: 598-609) sugerem que Dp4cycH4mT apresenta vantagens s
sobre Triapine® e Dp44mT.

Reivindicações

1. Composto, **caracterizado** pela formula geral (



(I)

na qual R^1 é ciclo-hexila ou etila;

e sais, hidratos e solvatos do mesmo.

2. Composto, de acordo com a reivinc **caracterizado** pelo fato de ser di-2-piridil-cetona-4-etil-4-metil-3-tio-semica sais, hidratos e solvatos da mesma.

3. Composto, de acordo com a reivinc **caracterizado** pelo fato de ser di-2-piridil-cetona-4-ciclo-hexil-4 semicarbazona, e sais, hidratos e solvatos da mesma.

4. Composto, de acordo com qualquer reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que os sais são sais farmace aceitáveis.

5. Composto, de acordo com a reivinc **caracterizado** pelo fato de que é cloridrato de di-2-piridil-cetona-4-etil-4 semicarbazona.

6. Composto, de acordo com a reivinc **caracterizado** pelo fato de que é cloridrato de di-2-piridil-cetona-4-ciclo-hex tio-semicarbazona.

7. Composição farmacêutica, **caracterizada** p compreender um composto de fórmula (I), ou um sal, hidrato ou solvato do acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em conjunto com um diluente ou adjuvante farmaceuticamente aceitável.

8. Método de tratamento de câncer em um **caracterizado** pelo fato de compreender a administração, a um mamífer necessite, de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula (I), ou hidrato ou solvato do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicaçõe de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **car** pelo fato de que o câncer é selecionado a partir de melanoma, câncer de pele seio, câncer da próstata, câncer da bexiga, câncer do fígado, câncer gast câncer do cólon e do reto, câncer do cérebro, câncer da cabeça e do pesco

pulmão e tumores hematológicos (por exemplo, leucemias e linfomas).

10. Método, de acordo com a reivindicaçã **caracterizado** pelo fato de que o câncer é selecionado a partir de câncer p câncer do pulmão e câncer do cérebro.

11. Método, de acordo com a reivinc **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

12. Método, de acordo com qualquer reivindicações 8 a 11, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um ser hu

13. Aplicação de um composto de fórmula (I), ou hidrato ou solvato do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindica **caracterizada** pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o de câncer.

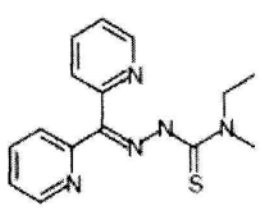
14. Aplicação, de acordo com a reivindi **caracterizada** pelo fato de que o câncer é selecionado a partir de melanoma pele, câncer do seio, câncer da próstata, câncer da bexiga, câncer do fíga gastrointestinal, câncer do cólon e do reto, câncer do cérebro, câncer da c pescoço, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer uterino, câncer ovaria cervical, câncer do pulmão e tumores hematológicos (por exemplo, le linfomas).

15. Aplicação, de acordo com a reivindi **caracterizada** pelo fato de que o câncer é selecionado a partir de câncer p câncer do pulmão e câncer do cérebro.

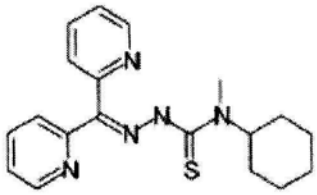
16. Aplicação, de acordo com a reivindi **caracterizada** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

17. Composto de fórmula (I), ou um sal, hidrato do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracte** fato de ser para aplicação no tratamento de câncer.

A

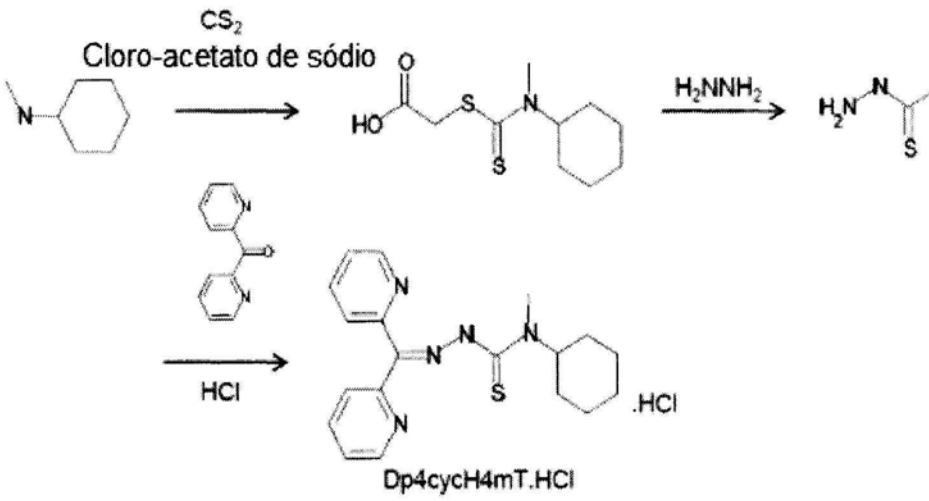


Dp4e4mT



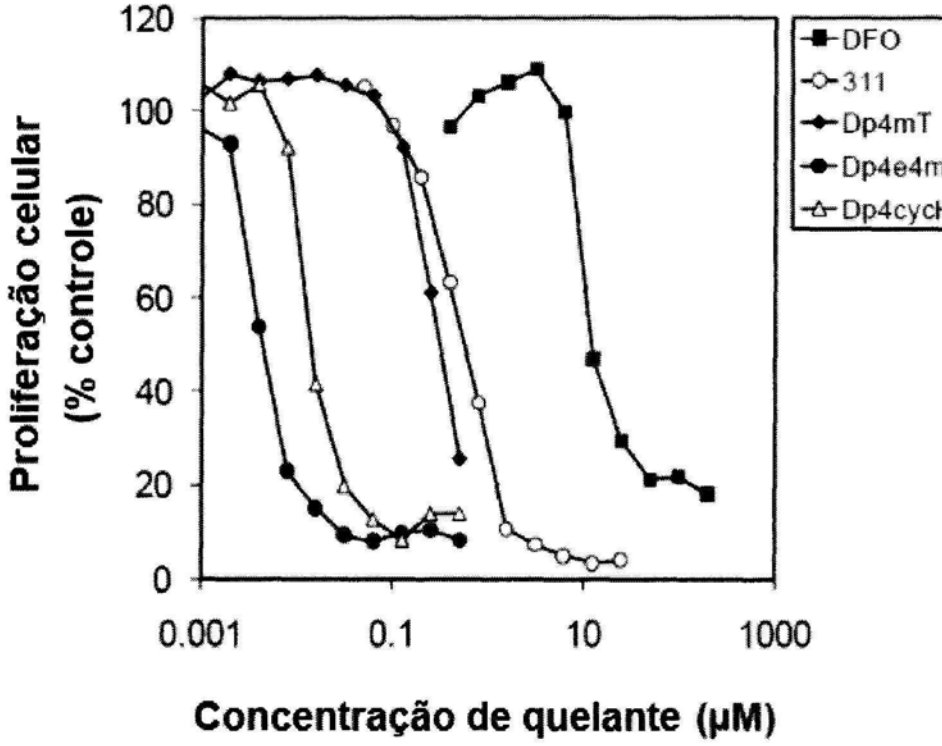
Dp4cycH4mT

B



5

Figura 1


120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.1
10
1000
Proliferação celular
(% controle)
Concentração de quelante (μM)
DFO
311
Dp4mT
Dp4e4m
Dp4cyc

5

Figura 2

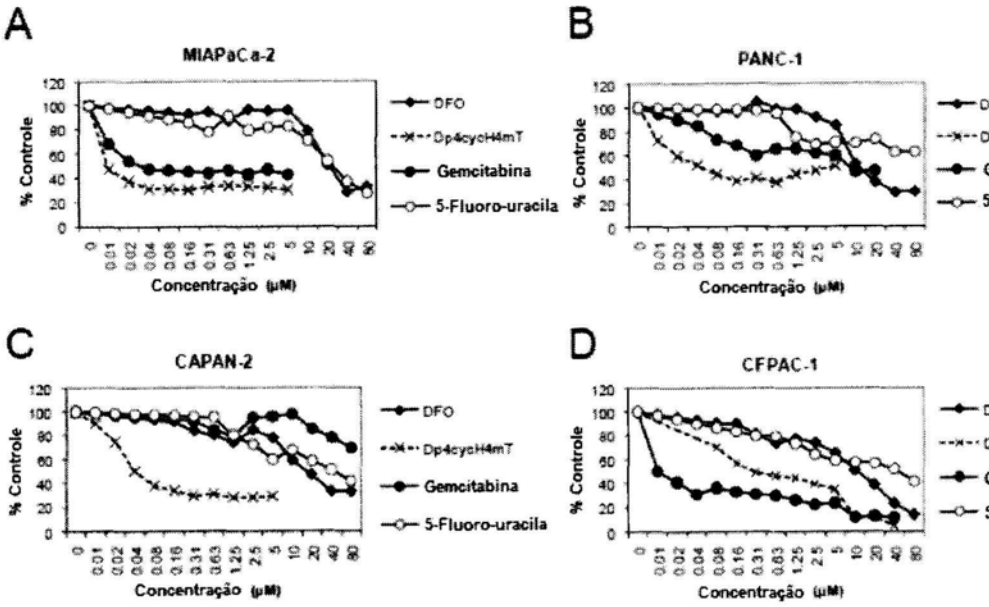
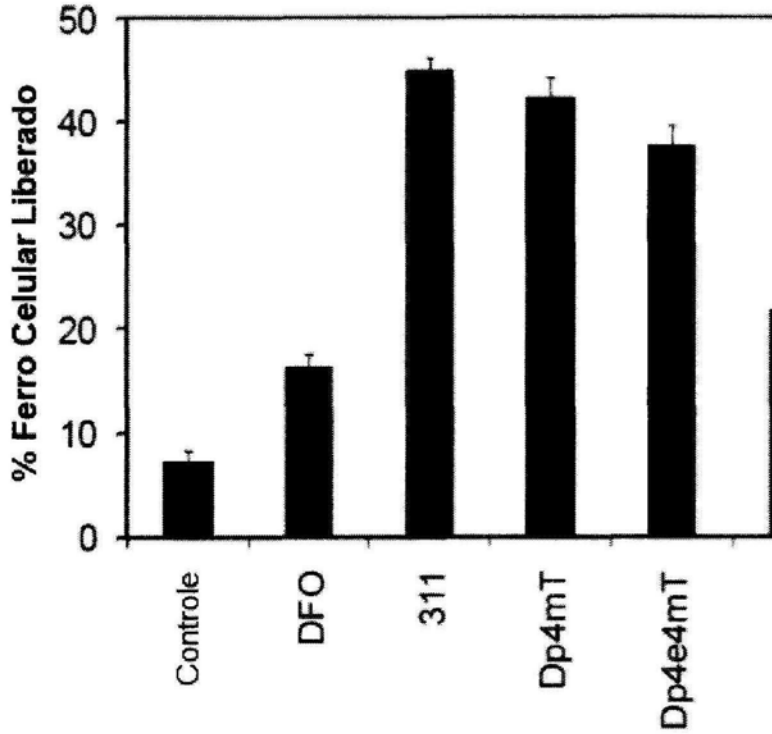
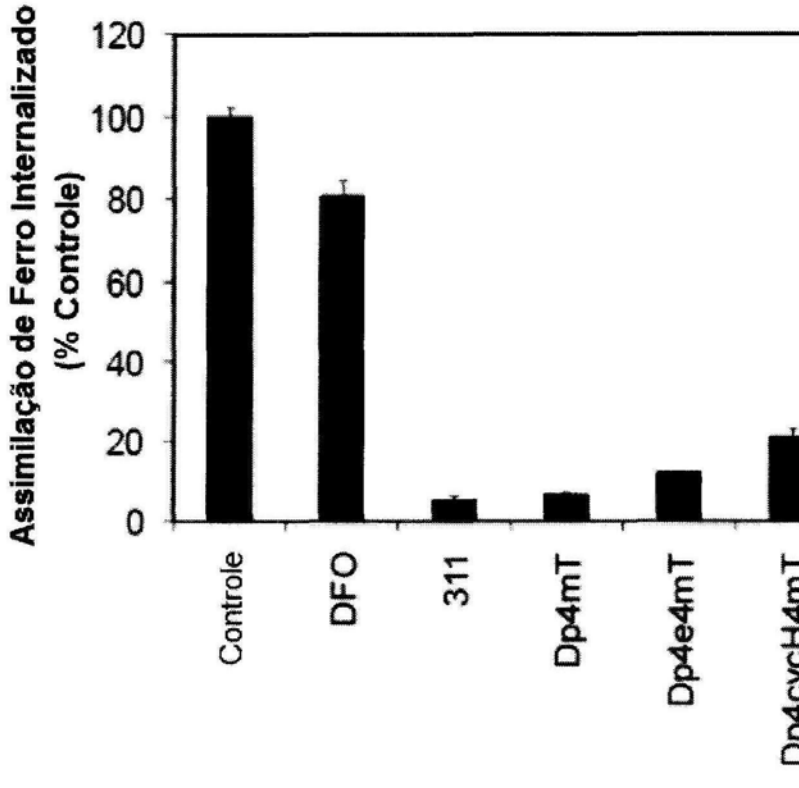

A
MIAPaCa-2
B
PANC-1
C
CAPAN-2
D
CFPAC-1
% Controle
Concentração (µM)
DFO
Dp4cycH4mT
Gemcitabina
5-Fluoro-uracila

Figura 3

A


% Ferro Celular Liberado
50
40
30
20
10
0
Controle
DFO
311
Dp4mT
Dp4e4mT

B


Assimilação de Ferro Internalizado (% Controle)
120
100
80
60
40
20
0
Controle
DFO
311
Dp4mT
Dp4e4mT

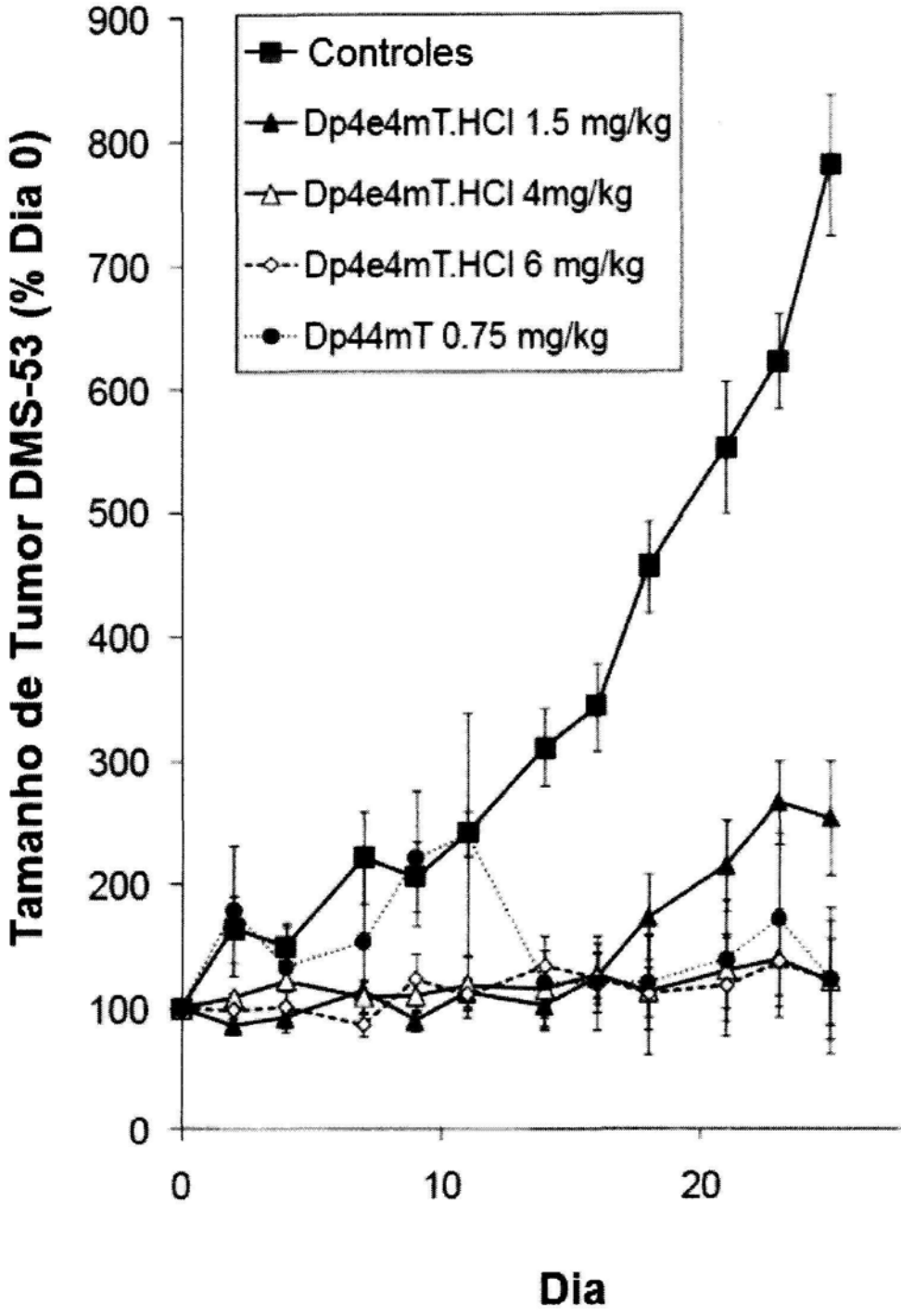
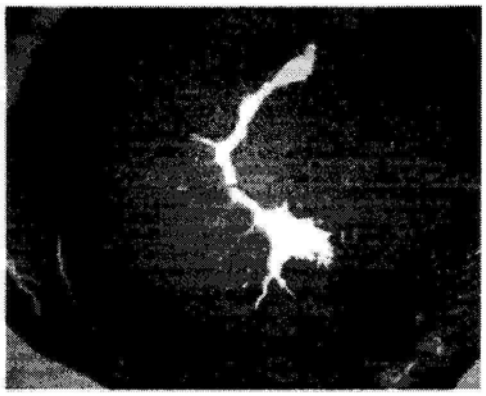
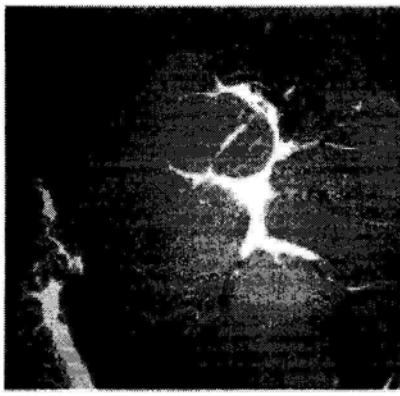

Controles
Dp4e4mT.HCl 1.5 mg/kg
Dp4e4mT.HCl 4mg/kg
Dp4e4mT.HCl 6 mg/kg
Dp44mT 0.75 mg/kg
Tamanho de Tumor DMS-53 (% Dia 0)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
Dia

Figura 5



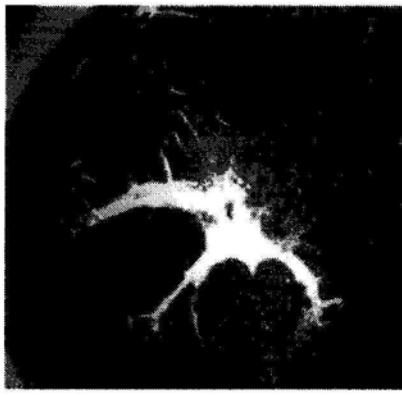
Controles



Dp4e4mT-HCl
1.5 mg



Dp4e4mT-HCl
4 mg

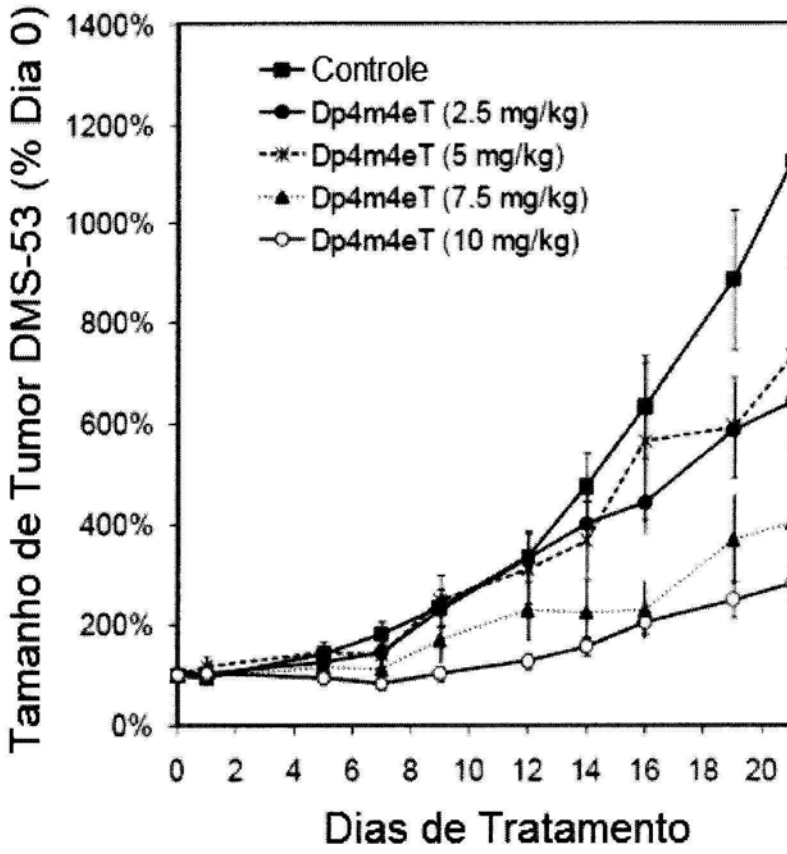


Dp4e4mT-HCl
6 mg

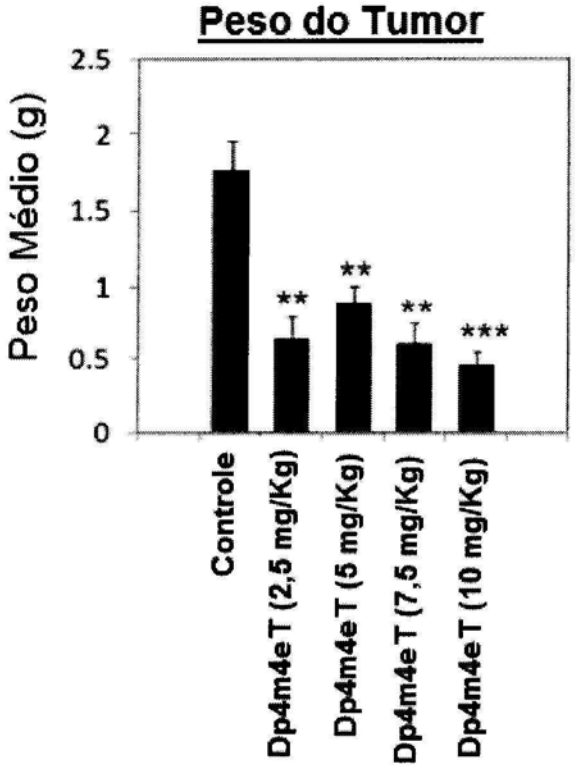


Dp44mT
0.75 mg

A


Tamanho de Tumor DMS-53 (% Dia 0)
1400%
1200%
1000%
800%
600%
400%
200%
0%
Controle
Dp4m4eT (2.5 mg/kg)
Dp4m4eT (5 mg/kg)
Dp4m4eT (7.5 mg/kg)
Dp4m4eT (10 mg/kg)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Dias de Tratamento

B


Peso do Tumor
Peso Médio (g)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
**
**
***
Controle
Dp4m4eT (2,5 mg/Kg)
Dp4m4eT (5 mg/Kg)
Dp4m4eT (7,5 mg/Kg)
Dp4m4eT (10 mg/Kg)

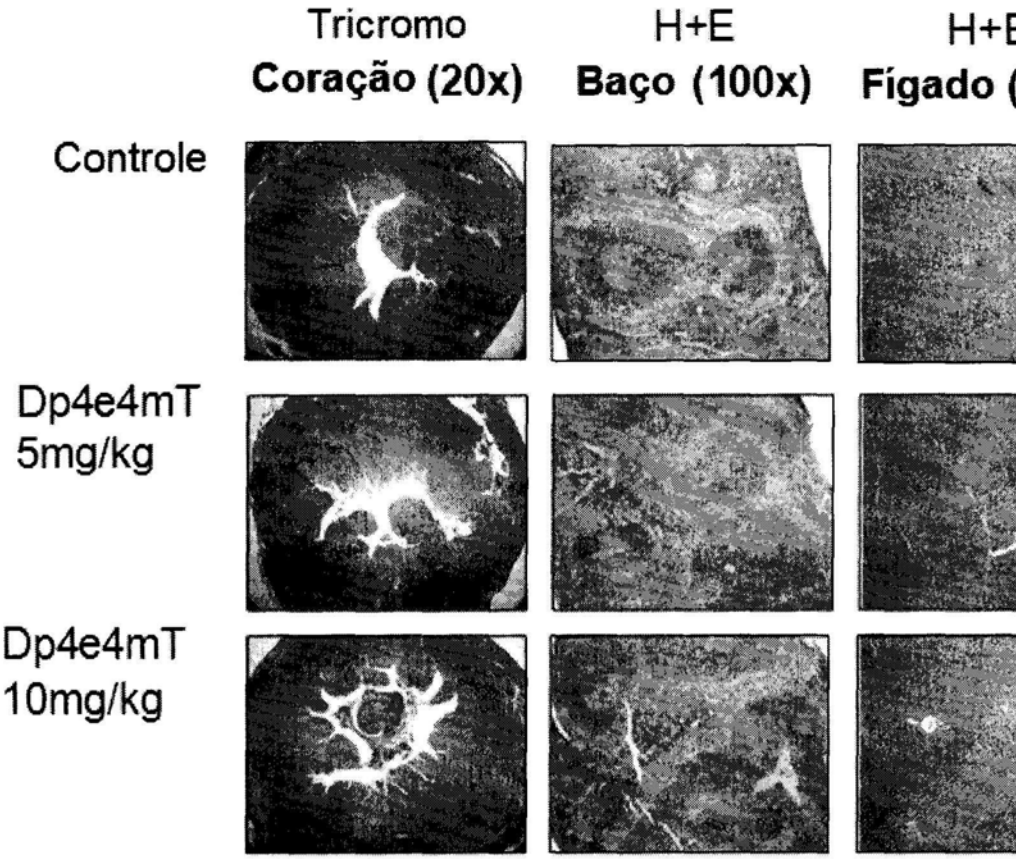
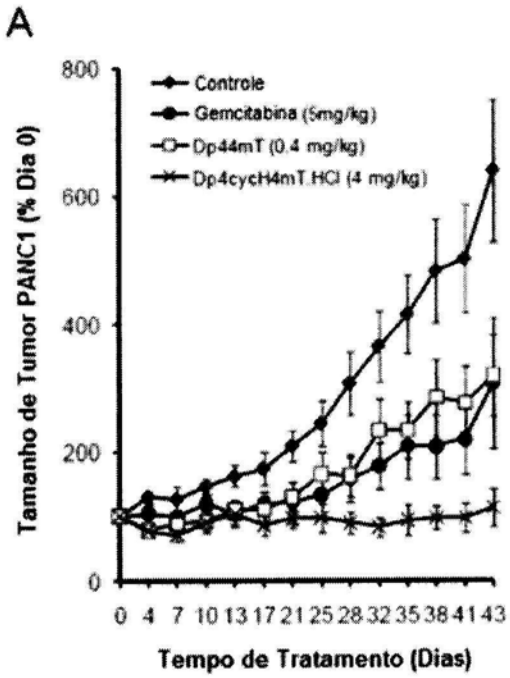
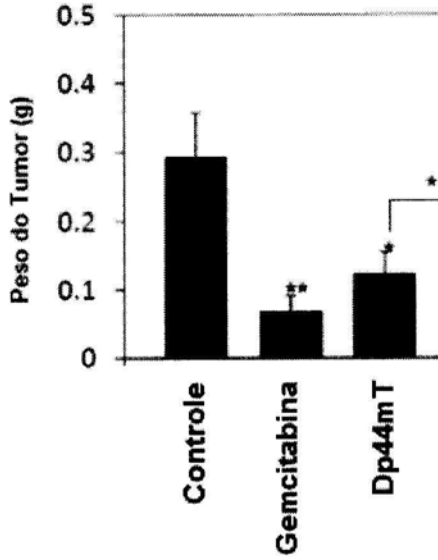

Tricromo
Coração (20x)
H+E
Baço (100x)
H+E
Fígado (
Controle
Dp4e4mT
5mg/kg
Dp4e4mT
10mg/kg

Figura 8


A
800
600
400
200
0
Tamanho de Tumor PANC1 (% Dia 0)
Controle
Gemcitabina (5mg/kg)
Dp44mT (0.4 mg/kg)
Dp4cycH4mT.HCl (4 mg/kg)
0 4 7 10 13 17 21 25 28 32 35 38 41 43
Tempo de Tratamento (Dias)


B
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Peso do Tumor (g)
**
*
Controle
Gemcitabina
Dp44mT

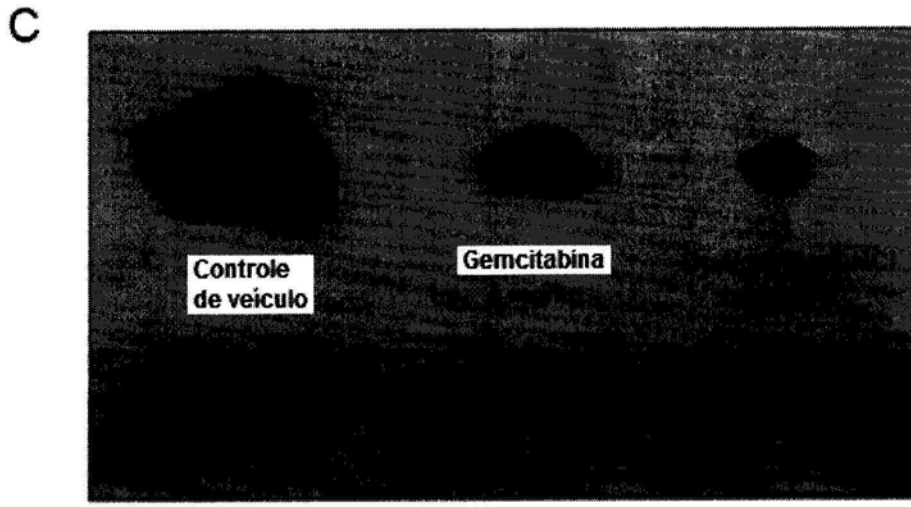

C
Controle
de veículo
Gemcitabina

Figura 9

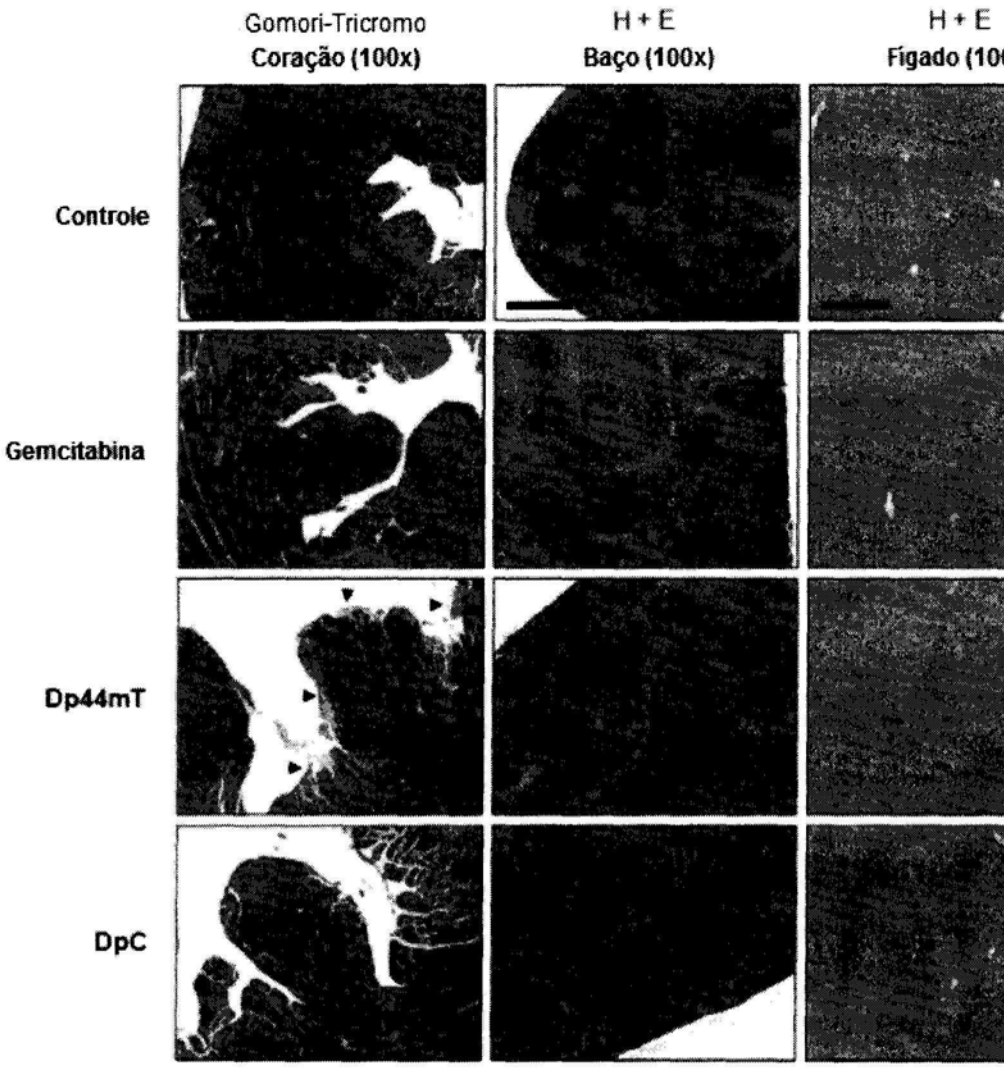
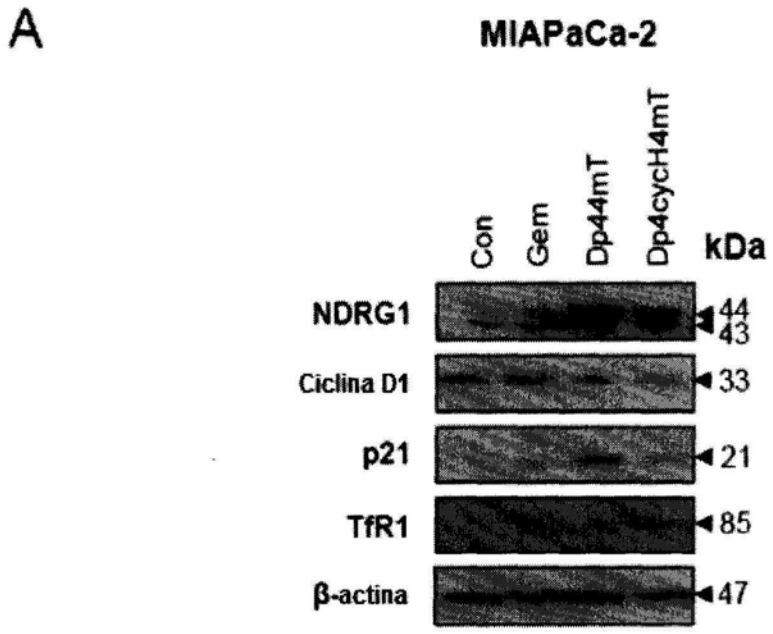

Gomori-Tricromo
Coração (100x)
H + E
Baço (100x)
H + E
Fígado (10
Controle
Gemcitabina
Dp44mT
DpC

Figura 10


A
MIAPaCa-2
Con
Gem
Dp44mT
Dp4cycH4mT
kDa
NDRG1
44
43
Ciclina D1
33
p21
21
TfR1
85
β-actina
47

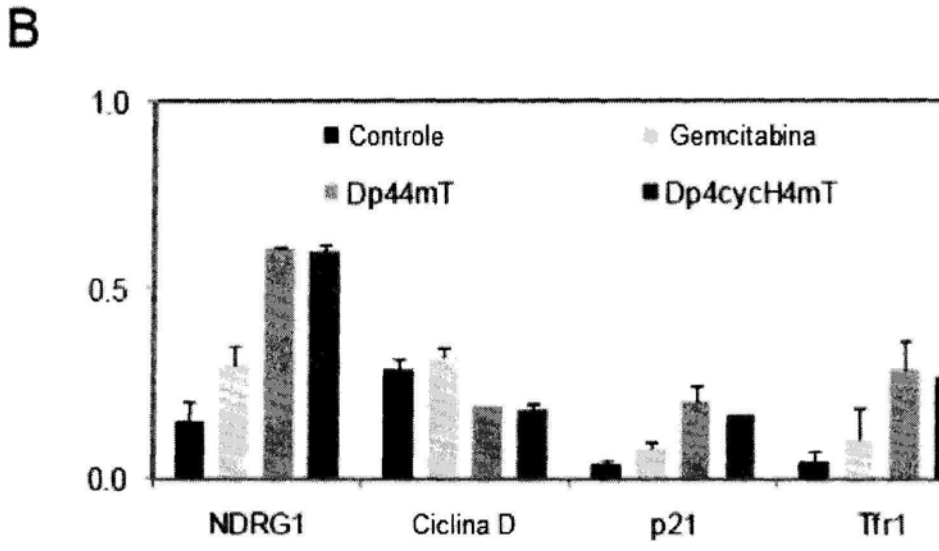

B
1.0
0.5
0.0
Controle
Gemcitabina
Dp44mT
Dp4cycH4mT
NDRG1
Ciclina D
p21
Tfr1

Figura 11

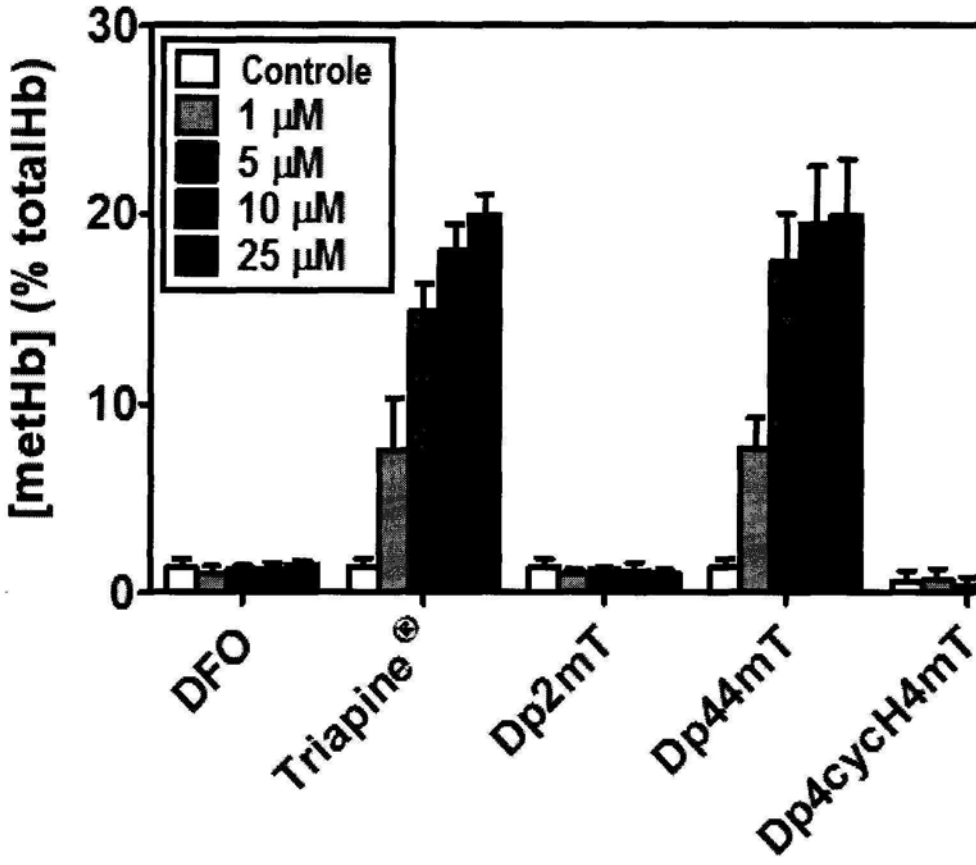

30
20
10
0
[metHb] (% totalHb)
Controle
1 µM
5 µM
10 µM
25 µM
DFO
Triapine®
Dp2mT
Dp44mT
Dp4cycH4mT

Figura 12

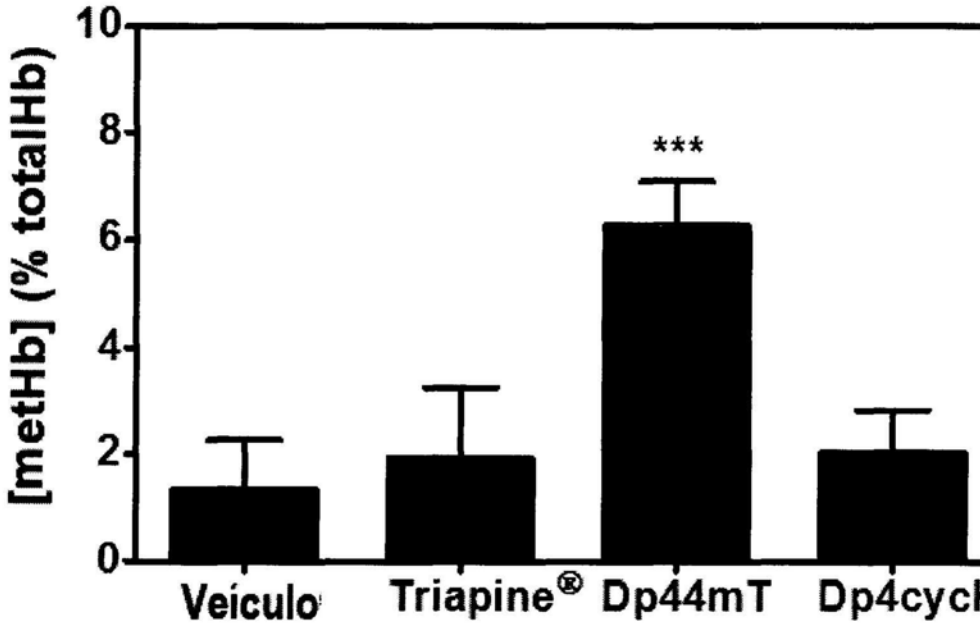


Figura 13

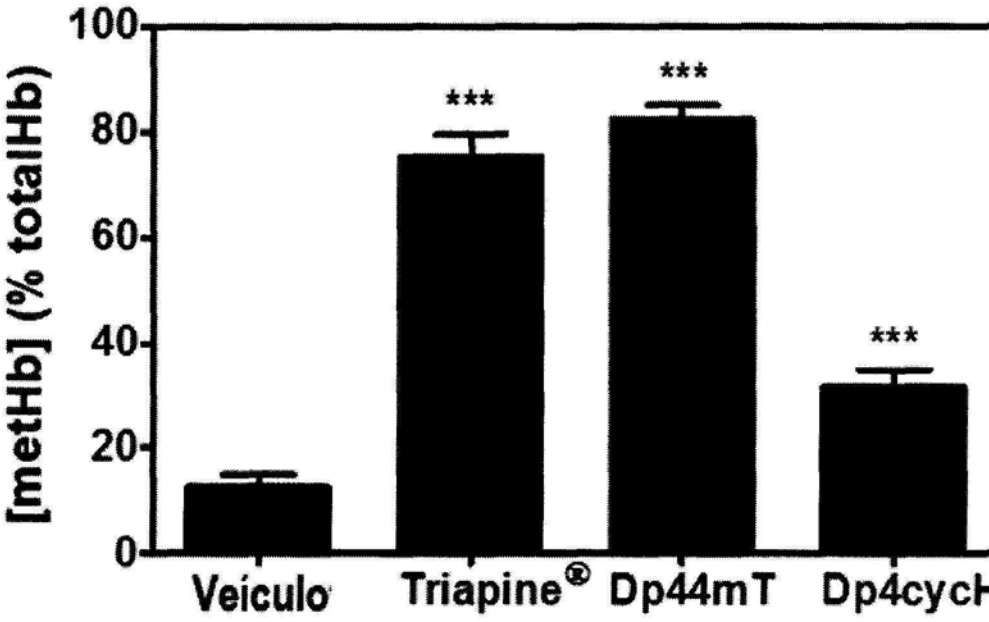

100
80
60
40
20
0
[metHb] (% totalHb)
***
***
***
Veículo
Triapine®
Dp44mT
Dp4cycH

Figura 14

Resumo

Compostos de tio-semicarbazona e apli

tratamento de câncer

A presente invenção se refere a compostos de
semicarbazona, a composições farmacêuticas contendo aqueles compo
aplicação daqueles compostos e composições no tratamento de câncer.