



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

(21) PI 1105924-9 A2



* B R P I 1 1 0 5 9 2 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 19/12/2011

(43) Data da Publicação: 12/11/2013

(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:

C07D 219/04

C07C 227/00

A61K 31/473

A61P 35/00

(54) Título: COMPOSTO MOLECULAR PARA DESTRUIÇÃO SELETIVA DE CÉLULAS DE TUMORES SÓLIDOS

(73) Titular(es): Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CBPF, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE

(72) Inventor(es): Gerson Silva Paiva, Ivone Antônia de Souza, Marcos de Castro Carvalho

(57) Resumo: COMPOSTO MOLECULAR PARA DISTRIBUIÇÃO SELETIVA DE CÉLULAS DE TUMORES SÓLIDOS. A presente invenção refere-se à oncologia, em particular a um composto molecular, denominado aqui de oncoloose, capaz de destruir seletivamente células de tumores sólidos sem afetar células saudáveis de replicação rápida. A presente invenção fornece um produto que compreende um composto molecular, denominado oncoloose, guiado de forma seletiva para interior dos tumores, através de um grupamento carboxílico que neutraliza a sua carga elétrica negativa, para carrear o fármaco acridina ao DNA das moléculas tumorais, impedindo a sua reprodução e levando as células tumorais à apoptose ou autodestruição celular.

**COMPOSTO MOLECULAR PARA DESTRUIÇÃO SELETIVA DE CÉLULAS DE
TUMORES SÓLIDOS**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um composto molecular, denominado aqui de "oncoloose", capaz de destruir seletivamente células de tumores sólidos sem afetar células saudáveis de replicação rápida.

10

Antecedentes da Invenção

Os compostos quimioterápicos são aqueles comumente utilizados no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando a quimioterapia é aplicada ao câncer, é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral.

15

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. A partir da publicação de estudos clínicos feitos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, verificou-se avanço crescente da quimioterapia antineoplásica. Atualmente, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos encontram-se disponíveis para uso na prática clínica. Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer e permitido maior número de curas.

20

25

30

A quimioterapia funciona ao interromper ou retardar o crescimento de células de câncer, as quais crescem e se dividem rapidamente. Entretanto, a quimioterapia também pode danificar células saudáveis que se dividem rapidamente, como aquelas no revestimento da boca e intestino, as dos glóbulos brancos, responsáveis pela defesa, ou as que fazem o cabelo

35

crescer. Isso pode resultar muitas vezes em complicações renais e cardíacas.

O principal objetivo no desenvolvimento de agentes quimioterápicos antineoplásicos é a melhoria da seletividade e a consequente redução dos efeitos colaterais indesejáveis. Uma das possibilidades que surgiu no estado da arte para resolver esse problema, mencionada na Patente US 5.622.936, foi o uso de pró-drogas. Pró-drogas são drogas que são ativadas no sítio ou dentro da célula alvo, ou que são detoxicadas com células não-alvo.

Algumas moléculas com atividade antitumoral foram citadas em documentos de patentes, inclusive documentos brasileiros, mas nenhuma delas atingia somente as células tumorais. O pedido de patente brasileiro BR0601827 (Pitta, I.R. et al.), depositado em 24 de março de 2006, refere-se a compostos derivados acridino-tiazolidínicos denominados tiazacridinas e imidazacridinas, que tiveram ação antitumoral, e os respectivos processos de síntese química, bem como seu uso terapêutico como fármaco capaz de produzir efeitos antitumorais.

É conhecido no estado da técnica que azolidinas e acridinas são eficazes no combate de processos infecciosos. A acridina (di-benzeno[b,e]piridina ou 10-azaantraceno) foi isolada por Graebe em 1871; isolada a partir de óleos de alto ponto de ebulição em 1926, por Wirth (Patentes DE 440771 e GB 214756); preparada a partir do ácido N-fenilantranílico por Perkin, em 1923 (Patente GB 214756); a partir de Ca-antranilato por Koller, em 1928 (*Monatsh.* 50,51); passando o vapor de benzilanilina por um fio de platina quente por Myer, em 1916 (*Monatsh.*, 37,698) e por Ullmann, em 1907 (*Ber.*40, 2521). As acridinas eram comumente utilizadas em corantes manufaturados e intermediários, sendo alguns destes corantes utilizados como antisépticos, como, por exemplo, 9-aminoacridina, acriflavina e proflavina.

Lhome et al. (Pedido de Patente PCT WO9425439, de 14 de novembro de 1994; FR935283, de 04 de maio de 1993) prepararam substâncias derivadas de acridina com propriedades antineoplásicas, como o (3,6-bis-dimetilamino-acridin-4-il)-

metanol. Compostos conjugados por condensação do ácido porfirínico com derivados de 9-aminoacridinas foram preparados por Karagianis & James, *Aust. J. Chem.* 1995, 48(10), p. 1693-1705. Os compostos conjugados foram isolados por cromatografia
5 de exclusão de tamanho em rendimentos de mais de 35% e purificados por HPLC semi-preparado para pureza de 98%. Duflos *et al.* (Documento de Patente FR2716454, de 25 de agosto de 1995; Pedido de Patente FR941971, de 22 de fevereiro de 1994) sintetizaram derivados de 4-(aminometil)-3-
10 dimetilaminoacridina como agentes anticancerígenos. Novamente, nenhum dos documentos citados apresentou compostos com alta seletividade.

Ferlin *et al.* (*Eur. J. Med. Chem.* 35:827-837, 2000) prepararam derivados substituídos de 9-acridina e azacridina
15 (análogos de m-AMSA) com atividade antitumoral contendo efeito inibitório sobre a DNA-topoisomerase II. Apesar de apresentar atividade seletiva para a DNA-topoisomerase, é conhecido por apresentar uma pequena taxa de toxicidade.

Adjei (*Investigational New Drugs*, 1999, v. 17, p. 43-48) sintetizou pirazoloacridinas (PZA) combinando a atividade das
20 acridinas de intercalarem o DNA com a hipóxia seletiva conferida pela redução do grupo nitro do anel acridínico. Estudos recentes sugerem que a PZA pode ser um duplo inibidor das DNA-topoisomerasas I e II que exercem seus efeitos pela
25 diminuição da formação de adutores da DNA-topoisomerase. De acordo com o autor, o mecanismo de ação da PZA tem exibido atividade antitumoral em modelos pré-clínicos *in vivo*. O composto utilizado pelo autor foi a 9-metoxipirazoloacridina.

Para reduzir seus efeitos colaterais devido a não
30 seletividade desses medicamentos antineoplásicos, estes são unidos quimicamente a moléculas de açúcares, visto que os tumores malignos necessitam de cerca de dez vezes mais glicose que as células saudáveis. Exemplo de fármacos antineoplásicos
35 carregados por glicose são D-19575, também conhecido como glufosfamida, publicado na Patente US nº 5.622.936, e derivados de glicose-clorambucila (Halmos, T., Santarromana, M., Antonakis, K., Sherman, D. *European Journal of Pharmacology*: 318: 477-484, 1996). Contudo, estes medicamentos

acabam afetando as células saudáveis, já que estas também necessitam de glicose para sobreviverem.

Uma alternativa utilizada no estado da arte é o uso de agentes intercalantes, com capacidade de se inserir entre as camadas de pares de bases dos ácidos nucleicos, deformando a dupla hélice e impedindo a replicação e a transcrição. Exemplos de antibióticos antitumorais que utilizam esse mecanismo de ação compreendem a actinomicina-D, a adramicina e a proflavina (Patrick, G., *Na Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University, 1995).

Sem exceção, os tumores sólidos apresentam uma elevada acidez em seu tecido celular, caracterizada pela presença de íons de hidrogênio (H^+). É bem conhecido no estado da arte que quando tumores sólidos atingem determinado tamanho, a penetração do oxigênio no mesmo torna-se limitada. Sob tais condições, a fosforilação oxidativa não pode prosseguir normalmente por causa da insuficiência de oxigênio, resultando em elevada produção de ácido láctico, o que leva à acidificação do tecido tumoral maligno, permitindo inclusive a sua proliferação (Gatenby, R.A., Gillies, R. J. *Nat. Rev. Cancer* 4:891-899, 2004; Warburg, O. A Review. *Science* 123: 309-315, 1956).

Terapias anti-câncer, chamadas terapias pH, utilizam injeções locais de sais de elementos muito alcalinos (básicos), como o céσιο, o potássio e o rubídio, com a finalidade de reduzirem a acidez do tumor, levando as células à morte (Masco, H.L. Patente US n° 3.614.242, 1972). Entretanto, a mesma terapia não funciona quando o tumor já se espalhou pelo corpo, causando a metástase.

30

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à oncologia, em particular a um composto molecular, denominado aqui de "oncoloose", capaz de destruir seletivamente células de tumores sólidos sem afetar células saudáveis de replicação rápida.

Adicionalmente, a presente invenção visa proporcionar um processo para produção de um fármaco antitumoral capaz de

chegar seletivamente às células de tumores sólidos sem promover quaisquer danos às células saudáveis utilizando um carreador do tipo carboxila que é sensível à acidez presente em todos os tipos de tumores sólidos malignos.

5 Em um aspecto da invenção, é fornecido um processo de intercalação da acridina ao DNA das células tumorais, levando-as a apoptose, também denominada morte celular programada.

Dessa forma, na presente invenção, é fornecido um produto que compreende um composto molecular denominado ONCOLOOSE que
10 é guiado de forma seletiva para o interior dos tumores. Este composto é atraído para o interior dos tumores pela acidez característica dos tumores sólidos, através de um grupamento carboxílico que neutraliza a sua carga elétrica negativa, devido a esta acidez tumoral, para carrear o fármaco acridina
15 ao DNA das células tumorais, impedindo a sua reprodução e levando as células tumorais à apoptose ou auto-destruição celular.

Estes e outros objetos da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da
20 invenção e das reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 representa a estrutura molecular do composto anti-
25 tumoral objeto da presente invenção.

A Figura 2 representa os tipos de acridina que serão ligados ao grupo carboxílico, este último, carreador do fármaco para dentro dos tumores.

30

A Figura 3 apresenta o mecanismo de ação antitumoral da 9-acridina-carboxilato.

A Figura 4 apresenta o desenho da 9-acridina-carboxilato
35 intercalada ao DNA.

A Figura 5 apresenta o procedimento para a síntese do composto ONCOLOOSE

A Figura 6 apresenta fotos do ensaio *in vivo* realizado com camundongos com Sarcoma 180, utilizando doses de 10 mg/Kg e 20 mg/Kg.

5

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à oncologia, em particular a um composto molecular, denominado aqui de "oncoloose", capaz de destruir seletivamente células de tumores sólidos sem afetar células saudáveis de replicação rápida.

Adicionalmente, a presente invenção visa proporcionar um processo para produção de um fármaco antitumoral capaz de chegar seletivamente às células de tumores sólidos sem promover quaisquer danos às células saudáveis utilizando um carreador do tipo carboxila que é sensível à acidez presente em todos os tipos de tumores sólidos malignos.

Conforme já explicitado anteriormente, a quimioterapia funciona interrompendo ou retardando o crescimento de células cancerosas, as quais crescem e se dividem rapidamente. Entretanto, como a quimioterapia também pode danificar células saudáveis de divisão rápida, é necessário reduzir ou eliminar os efeitos colaterais nesse tipo de célula.

Para reduzir seus efeitos colaterais devido a não seletividade dos medicamentos antineoplásicos, estes são unidos quimicamente a moléculas de açúcares, visto que os tumores malignos necessitam de cerca de dez vezes mais glicose que as células saudáveis. Podem ser citados como exemplos de medicamentos antineoplásicos carreados por glicose o D-19575 ou glufosfamida e derivados de glicose-clorambucila, porém estes medicamentos também afetam células saudáveis que também necessitam de glicose.

Tumores sólidos apresentam uma elevada acidez em seu tecido celular, caracterizada pela presença de íons de hidrogênio (H^+). Entretanto, quando tumores sólidos atingem determinado tamanho, a penetração do oxigênio no mesmo torna-se limitada. Sob tais condições, a fosforilação oxidativa não pode prosseguir normalmente por causa da insuficiência de

oxigênio, resultando em elevada produção de ácido láctico. Essa redução de ácido láctico leva à acidificação do tecido tumoral maligno, permitindo a sua proliferação. Essa característica de elevada acidez será aproveitada aqui para
5 guiar um fármaco para o interior de tumores malignos de forma seletiva sem afetar células saudáveis que se multiplicam rapidamente, visto que as células saudáveis não produzem ácido láctico. Um grupamento carboxílico será usado para reagir com a acidez dos tumores sólidos malignos e carrear o fármaco de
10 forma seletiva apenas para o interior das células tumorais.

Em um aspecto da invenção, é fornecido um processo de intercalação da acridina ao DNA das células tumorais, levando-as a apoptose, também denominada morte celular programada.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um produto que
15 compreende um composto molecular denominado ONCOLOOSE que é guiado de forma seletiva para o interior dos tumores. Este composto é atraído para o interior dos tumores pela acidez característica dos tumores sólidos, através de um grupamento carboxílico que neutraliza a sua carga elétrica negativa
20 devido a esta acidez tumoral (visto que moléculas dotadas de carga elétrica atravessam a membrana das células em pequenas quantidades enquanto que moléculas neutras atravessam a mesma com grande facilidade, pois são solúveis nas membranas lipídicas das células) para carrear o fármaco acridina ao DNA
25 das células tumorais, impedindo a sua reprodução e levando as células tumorais à apoptose ou auto-destruição celular.

O composto ONCOLOOSE compreende uma molécula de acridina (Figura 1.1) ligada quimicamente a um grupamento carboxílico (Figura 1.2) que, em meio neutro (sangue e tecidos saudáveis)
30 têm carga negativa (Figura 1.3), esta última com forte afinidade a íons de hidrogênio do tumor (Figura 1.4), sendo que tal combinação neutraliza a carga da carboxila (Figura 1.5) e leva a molécula a ser absorvida nesta forma pelo tumor. A absorção requer a passagem através da membrana lipídica das
35 células, que é determinada pela presença ou não de carga elétrica na molécula: moléculas dotadas de carga elétrica atravessam a membrana em pequenas quantidades enquanto que moléculas neutras atravessam a mesma com grande facilidade. Os

tumores têm pH entre 6 e 7, ou seja, há íons de hidrogênio (H⁺) e isso favorece a neutralização da carga elétrica negativa da molécula (Figura 1.3), fazendo com que sejam absorvidas pelas células cancerosas em grande quantidade.

5 O mecanismo de ação do composto ONCOLOOSE, ilustrado na Figura 3, mostra que a glicose é absorvida pelas células tumorais que contém em sua membrana 10 vezes mais receptores de insulina que uma célula saudável. Assim, o metabolismo da glicose nas células tumorais chega ao ácido pirúvico
10 (piruvato), mesmo na presença de oxigênio. O ácido pirúvico não metabolizado então tende a se concentrar na célula, elevando a acidez do seu meio. Isso faz com que haja a protonação da 9-acridina-carboxilato, tornando este com carga neutra. Essa carga neutra facilita a sua absorção para dentro
15 da célula tumoral. Dentro do núcleo das células, a 9-acridina-carboxilato se intercala ao DNA, impedindo assim a replicação celular, levando a célula a ativar certos genes, o que por sua vez leva a célula à morte programada (apoptose).

20 SÍNTESE DO COMPOSTO ONCOLOOSE

Procedimento para preparação do composto ONCOLOOSE

A síntese do presente composto anti-tumoral (e seus
25 derivados) segue uma reação de Pfitzinger (também conhecida como reação de Pfitzinger-Borsche) que consiste em uma reação química entre a isatina (ou 1H-indol-2,3-diona) e um composto fenólico em meio básico (geralmente hidróxido de potássio) (Figura 5).

30 Em um balão de 500 mL são colocados, um derivado de isatina e um derivado fenólico na proporção (m/m) 1:1 em presença de hidróxido de potássio em diclorometano anidro (51 mL). A mistura reacional é agitada a uma temperatura de 120°C e sob uma atmosfera inerte de argônio por um período de 4
35 horas. O derivado acridínico deve ser extraído do meio reacional com éter etílico e evaporado à secura. O mesmo deve ser posteriormente purificado através de cromatografia "flash"

em sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição n-hexano/AcOEt 7:3.

COMPOSTOS SINTETIZADOS EXEMPLARES

5

Os possíveis compostos de acridina que podem funcionar da mesma forma são os compreendidos no esquema da Figura 2.

10 A invenção e suas vantagens aparecerão mais claramente a partir do exemplo que se segue, em conjunto com as figuras acrescentadas, mas sem limitar o seu escopo.

AValiação DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

15 Para avaliar a atividade tumoral do composto ONCOLOOSE, foram realizados ensaios *in vivo* em camundongos albinos swiss no Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

20 Os tumores foram implantados nos camundongos seguindo a metodologia de Stock *et al.* (1995) e modificado por Komiyama (1992).

25 Os camundongos, pesando 30g cada um, foram divididos em dois grupos, um grupo que recebeu o tratamento e um grupo controle. O grupo tratado recebeu um dos possíveis comopostos quimioterápicos (9-acridina-carboxilato) por injeção intraperitoneal nas doses de 10 e 20 mg/kg, uma dose por dia durante o período de 6 dias. O grupo controle recebeu apenas placebo (solução salina a 2%) pelo mesmo período de tempo.

30 O objetivo do ensaio foi avaliar a atividade antitumoral nos tumores disponíveis (sarcoma 180). O resultado foi positivo para os tumores, sendo os percentuais de inibição tumoral respectivamente 48% e 90% nas doses de 10 mg/kg e 20mg/kg para os camundongos.

35 O mecanismo de ação do composto está ilustrado na Figura 3. A Figura 4 apresenta a ilustração da 9-acridina-carboxilato intercalada ao DNA, a Figura 5 apresenta o processo de síntese do composto e a Figura 6 apresenta fotos do ensaio *in vivo*, utilizando doses de 10 mg/Kg e 20 mg/Kg.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto molecular denominado Oncolose, caracterizado por compreender uma molécula de acridina ligada quimicamente a um grupamento carboxílico.
5
2. Composto molecular, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que, em meio neutro, possui carga negativa.
- 10 3. Composto molecular, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato que, em meio neutro sua carga negativa possui forte afinidade a íons de hidrogênio presentes em tumores.
- 15 4. Composto molecular, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por neutralizar a carga da carboxila e levar a molécula a ser absorvida para o interior do tumor.
- 20 5. Composto molecular, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por ser capaz de carrear o fármaco acridina ao DNA das células tumorais.
- 25 6. Composto molecular, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por impedir a reprodução de células tumorais gerando apoptose.
- 30 7. Processo para produção de fármaco antitumoral caracterizado por realizar uma reação de Pfitzinger-Borsche.
- 35 8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por extrair o derivado acridínico do meio reacional com éter etílico e evaporar à seco.

9. Processo de acordo com as reivindicações 7 e 8, caracterizado por purificar o derivado acridínico através de cromatografia "flash" em sílica gel 60.
- 5 10. Processo de acordo com as reivindicações 7 a 9, caracterizado por utilizar um sistema de eluição n-hexano/AcOEt 7:3.
- 10 11. Processo, de acordo com as reivindicações 7 a 10, caracterizado por ser para a produção de um fármaco antitumoral.
- 15 12. Processo, de acordo com as reivindicações 7 a 11, caracterizado por ser capaz de alcançar células tumorais sem promover danos às células saudáveis.
- 20 13. Uso do processo de acordo com as reivindicações 7 a 12, na preparação de um medicamento para tratar tumores sólidos.
14. Uso da acridina-carboxilato, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar tumores sólidos.
- 25 15. Uso da acridina-carboxilato, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar tumores sólidos, tratamento este que consiste em administrar doses de 10mg/Kg a 40 mg/Kg.
- 30 16. Uso da acridina-carboxilato, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar tumores sólidos, tratamento este que consiste em administrar doses de 10mg/Kg a 40 mg/Kg por injeção intraperitoneal.
- 35 17. Uso da acridina-carboxilato, de acordo com as reivindicações 15 e 16, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar tumores sólidos,

tratamento este que consiste em administrar uma dose por dia de 10mg/Kg a 40 mg/Kg por injeção intraperitoneal.

- 5 18. Uso da acridina-carboxilato, de acordo com as reivindicações 15 a 17, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar tumores sólidos, tratamento este que consiste em administrar uma dose por dia de 10mg/Kg a 40 mg/Kg por injeção intraperitoneal, por um período de 6 dias.

DESENHOS

Fig. 1

5

10

15

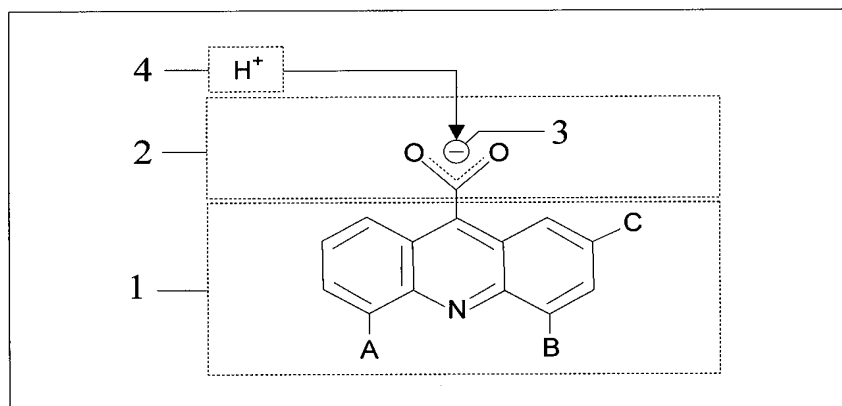
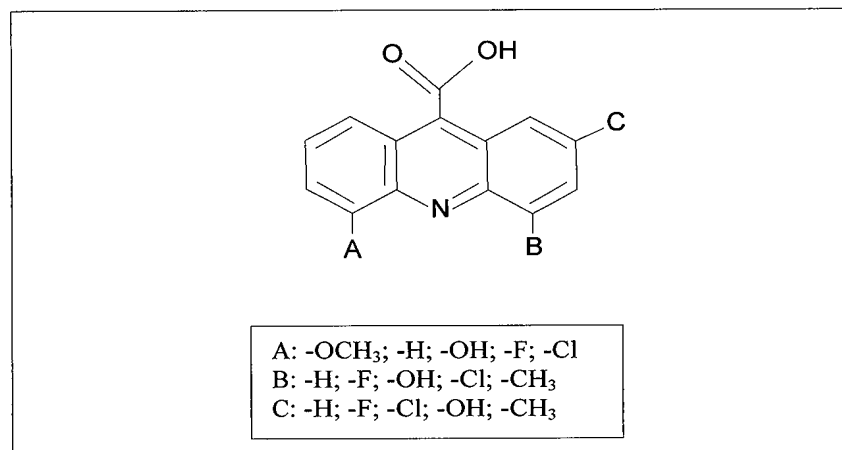


Fig. 2

20

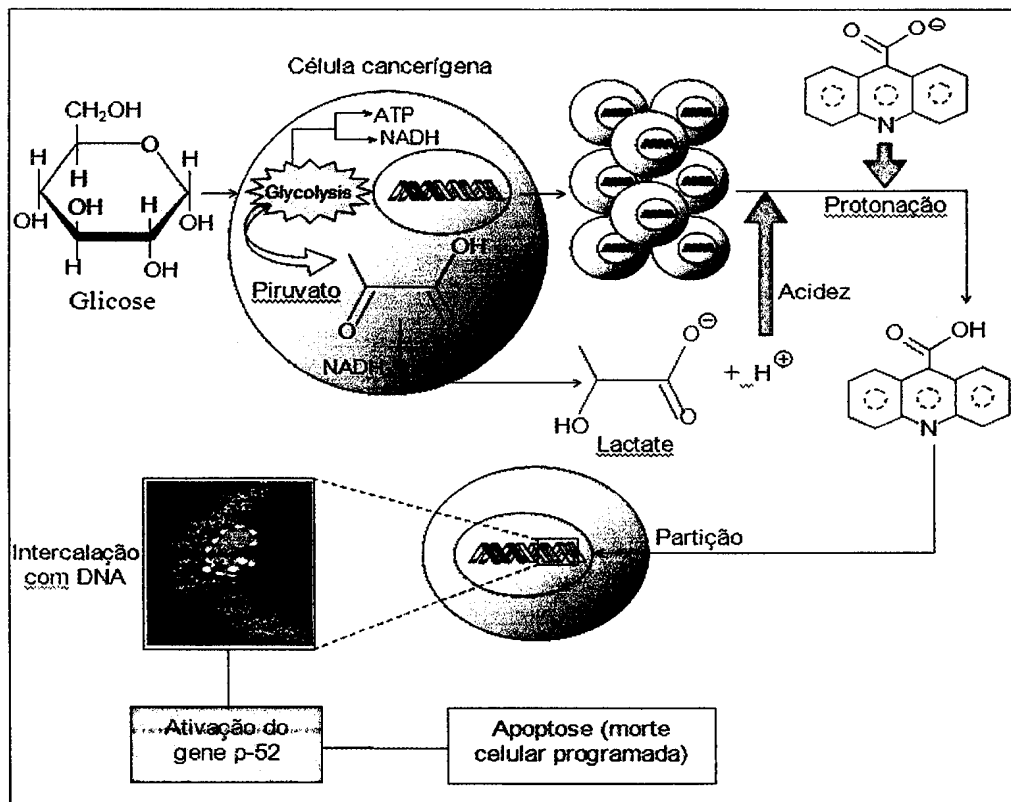
25



30

35

Fig. 3



5

Fig. 4

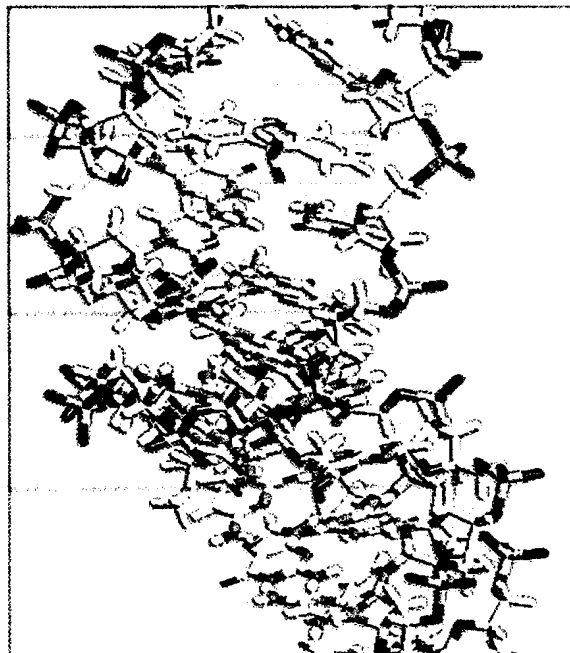
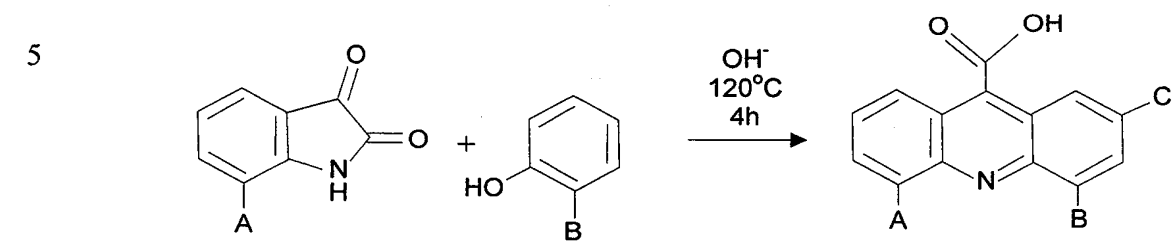


Fig. 5

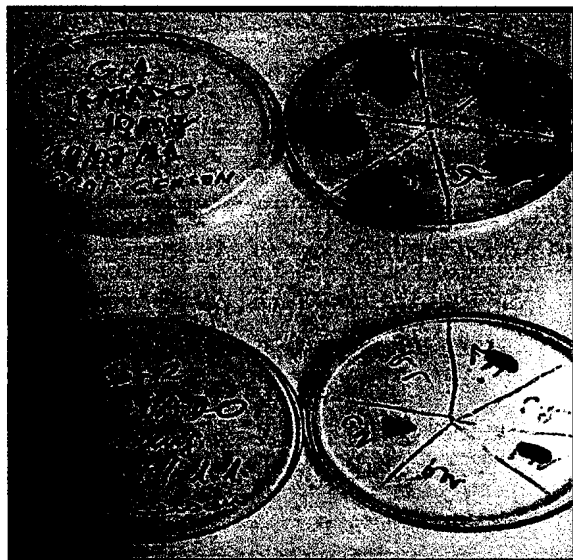


A: -OCH₃; -H; -OH; -F; -Cl
B: -H; -F; -OH; -Cl; -CH₃
C: -H; -F; -Cl; -OH; -CH₃

15

Fig. 6

20



COMPOSTO MOLECULAR PARA DESTRUIÇÃO SELETIVA DE CÉLULAS DE
TUMORES SÓLIDOS

RESUMO

5 A presente invenção refere-se à oncologia, em particular a um
composto molecular, denominado aqui de "oncoloose", capaz de
destruir seletivamente células de tumores sólidos sem afetar
células saudáveis de replicação rápida. A presente invenção
10 fornece um produto que compreende um composto molecular,
denominado oncoloose, guiado de forma seletiva para o interior
dos tumores, através de um grupamento carboxílico que
neutraliza a sua carga elétrica negativa, para carrear o
fármaco acridina ao DNA das células tumorais, impedindo a sua
15 reprodução e levando as células tumorais à apoptose ou auto-
destruição celular.