



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

(21) BR 112020025946-2 A2



(22) Data do Depósito: 19/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 23/03/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES BIFUNCIONAIS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int. Cl.: A61K 31/395; A61K 31/40; A61K 31/44; A61K 31/4427; A61K 31/4706; (...).

(30) Prioridade Unionista: 19/06/2018 AU 2018902181.

(71) Depositante(es): ARMACEUTICA, INC..

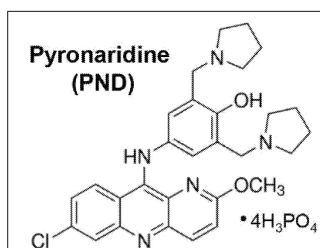
(72) Inventor(es): AGUILERA, RENATO.

(86) Pedido PCT: PCT IB2019055130 de 19/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/244050 de 26/12/2019

(85) Data da Fase Nacional: 17/12/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se ao uso de composições bifuncionais em métodos para o tratamento ou prevenção de câncer. As composições compreendem um ligante de DNA e um ligante de proteína para o tratamento ou prevenção de câncer, onde o ligante de DNA interfere com o metabolismo de DNA e o ligante de proteína interfere com as rotas de sinalização. Em particular, a presente invenção refere-se ao uso de pironaridina em métodos para o tratamento ou prevenção de câncer. A invenção refere-se também a composições, compostos e medicamentos compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína, por exemplo, composições, compostos e medicamentos compreendendo pironaridina.



COMPOSIÇÕES BIFUNCIONAIS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

Campo da invenção

[0001] A presente invenção refere-se a métodos para o tratamento ou prevenção de câncer. Em particular, a invenção contempla o uso de composições e compostos bifuncionais no tratamento ou prevenção de câncer. A invenção refere-se mais especificamente ao uso de composições compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína para o tratamento ou prevenção de câncer. A invenção refere-se também a composições, compostos e medicamentos compreendendo um intercalador de DNA e um inibidor de proteína.

Antecedentes da invenção

[0002] Qualquer discussão quanto o estado da técnica em todo o relatório não deve de forma alguma ser considerada uma admissão de que tal estado da técnica seja amplamente conhecido ou faça parte do conhecimento geral no campo.

[0003] As taxas de sobrevivência de cânceres são frequentemente muito proximamente ligadas à frequência de diagnósticos precoces, à agressividade do câncer, à disponibilidade de terapias anticâncer efetivas que são direcionadas para o câncer, a saúde global do indivíduo submetido a tratamento e/ou se existem opções, cirúrgicas ou outras, para a remoção de tumores e células cancerígenas.

[0004] Todos os tipos câncer são geralmente caracterizados por uma divisão celular descontrolada por meio de sinalização molecular anômala que permite que as células contornem a interrupção do ciclo celular/apoptose. A persistência da proliferação celular é frequentemente atribuída, pelo menos em parte, a desabilitação dos mecanismos celulares para a morte celular programada.

[0005] No entanto, é comum a muitos cânceres o fato do direcionamento indiscriminado de agentes terapêuticos, e a toxicidade dos agentes, limitar a eficácia de terapias anticâncer em seus tratamentos.

[0006] De maneira a contornar o problema do direcionamento, enquanto disponibilizando também terapias que têm aplicabilidade ampla, pode ser útil o direcionamento para processos celulares que sejam significativamente aumentados na proliferação celular associada com câncer, tal como a transcrição e replicação de DNA requerida durante a divisão celular. O modo de ação de tais terapias é frequentemente relacionado ao dano subsequente ao DNA iniciando rotas apoptóticas que levam à morte celular. A apoptose seletiva de células cancerígenas em proliferação é crucial para o tratamento efetivo do câncer.

[0007] Moléculas que ligam DNA podem interferir na síntese de DNA pelo bloqueio de interações entre o DNA e, por exemplo, fatores de transcrição, polimerases, ligases, nucleases, topoisomerasas e helicases. Em particular, ligantes de DNA que se intercalam entre os pares de bases das fitas de DNA são especialmente efetivos em perturbar o maquinário celular e complexos que são associados com, e se deslocam ao longo do comprimento do DNA durante a transcrição e replicação. No entanto, embora tais ligantes de DNA possam ser direcionados para células cancerígenas, podem impactar também em células sendo submetidas à divisão celular normal, e afetar a expressão de células não em divisão, levando a uma faixa potencial de efeitos colaterais.

[0008] Além disto, a ação de um ligante de DNA pode não ser suficiente porque, apesar do efeito terapêutico potencial de interferir na síntese de DNA de maneira a acionar a apoptose, a capacidade das células cancerígenas em evitar a morte celular pode anular o benefício terapêutico associado em causar dano no DNA às células cancerígenas.

[0009] Como tal, seria vantajoso combinar a atividade de um ligante de DNA com um meio para impedir as cascatas de sinalização que aumentam a

progressão tumoral e escape da morte celular e da resposta imune que pode normalmente ser acionada, por exemplo, por uma resposta de dano a DNA.

[0010] Uma classe de moléculas envolvida no escape de morte celular e promoção tumoral são as proteínas quinases, muitas das quais são quinases prolíficas e promíscuas com vastos conjuntos de substratos. Infelizmente, a inibição de uma proteína quinase envolvida em múltiplas rotas pode frequentemente apresentar efeitos colaterais graves, o que pode ser uma barreira para o desenvolvimento e comercialização de fármacos bem sucedidos.

[0011] Uma estratégia para acelerar a rota de desenvolvimento de fármaco para novas terapias é reaproveitar (ou reposicionar) fármacos licenciados existentes para novas indicações médicas. O reaproveitamento é efetivamente o reuso de fármacos com indicações específicas para novas aplicações, enquanto se tirando vantagem de conhecimento existente e dados de segurança. Exemplos recentes de reaproveitamento promissor de fármacos para o tratamento e prevenção de câncer incluem o uso de fármacos antiparasitários e antipsicóticos. Houve também estudos *in vitro* de alguns fármacos antimaláricos que se mostraram efetivos contra cepas resistentes de malária sendo reaproveitados para serem coadministrados com fármacos quimioterapêuticos de maneira a melhorar o tratamento pelo contraponto ou reversão da resistência a fármacos quimioterapêuticos. Certamente, embora o reaproveitando possa permitir a omissão de alguns aspectos do desenvolvimento de fármaco no que diz respeito aos dados de segurança, este não contorna a necessidade de demonstrar que o fármaco reaproveitado seja de fato efetivo para a nova aplicação por meio de estudos *in vivo* e testes em humanos, uma vez que dados *in vitro* frequentemente não são representativos de resultados *in vivo*.

[0012] Por exemplo, no US 20110300137 é descrito o uso do fármaco antimalárico, lumefantrine, em conjunto com fármacos quimioterapêuticos, onde o lumefantrine amplifica o tratamento do câncer pela inibição da autofagia. A autofagia é um mecanismo conhecido empregado por células tronco cancerígenas contra fármacos quimioterapêuticos, que permite que as células

permaneçam em um estado quiescente, antes de proliferar novamente uma vez o fármaco quimioterapêutico ter sido removido. No estado quiescente, as células cancerígenas estão protegidas contra os fármacos quimioterapêuticos, que em geral são orientados para células em proliferação, contribuindo assim para a resistência do câncer ao fármaco quimioterapêutico. Pela inibição da autofagia, as células cancerígenas não podem evitar os fármacos quimioterapêuticos e a resistência é reduzida, no entanto é ainda a atividade dos fármacos quimioterapêuticos que trata o câncer. Entretanto, embora o tenha mostrado atividade anti-autofagia em estudos *in vitro* no US 20110300137, nem o lumefantrine nem qualquer um dos vários fármacos antimaláricos citados (alguns dos quais, tal como a pironaridina, compartilham muito pouca similaridade com os outros membros do grupo supostamente apresentando a mesma atividade) foram mostrados ou sugeridos como apresentando qualquer atividade antiproliferativa ou apoptótica para tratar ou prevenir efetivamente células em divisão de um câncer separadamente, nem houve quaisquer estudos *in vivo* para validar estas descobertas.

[0013] Em um outro exemplo, o CN 1135977C descreve o uso do fármaco antimalárico, pironaridina, na preparação de combinação de fármacos antineoplásicos para o tratamento de tumores resistentes a múltiplos fármacos. Similarmente, este relatório descreve a coadministração ou pré-administração de pironaridina com Adriamicina (ADR: doxorubicina) para a resistência de linhagens celulares a fármacos múltiplos com resistência específica a ADR, de maneira a aumentar os efeito citotóxicos do ADR. Embora tenha sido mostrado que a apoptose de linhagens celulares MDR por ADR pode ser aumentada na presença de pironaridina em estudos *in vitro*, não foi demonstrado ou sugerido que a PND poderia induzir a apoptose em células em proliferação separadamente, nem que qualquer atividade suposta da pironaridina fosse transferível e replicável nos tumores reais. Da mesma forma, a invenção reivindicada em CN1 135977C é meramente para o uso de pironaridina em

combinação com fármacos antitumorais para a reversão de MDR em tumores resistentes *in vitro*.

[0014] Seria útil a capacidade de se redirecionar um fármaco conhecido que apresente atividades de ligação tanto a DNA quanto a proteína, tal como um fármaco antimalárico com uma longa história de uso tolerado, para novas aplicações terapêuticas de maneira a acelerar a rota de desenvolvimento de um fármaco para tratamentos de câncer.

[0015] É um objetivo da presente invenção superar ou melhorar pelo menos uma das desvantagens do estado da técnica, ou prover uma alternativa útil.

Sumário da invenção

[0016] Surpreendentemente foi encontrado que uma molécula compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína é útil para o tratamento e prevenção de câncer. Em particular, os presentes inventores encontraram que um fármaco antimalárico compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína, pironaridina, apresenta atividades antiproliferativas previamente conhecidas contra células cancerígenas em divisão, onde a atividade é seletiva, minimizando assim efeitos colaterais. Os presentes inventores são os primeiros a demonstrar em estudos *in vivo* que a pironaridina apresenta citotoxicidade seletiva e pode ser utilizada para o tratamento e/ou prevenção de câncer, em oposição a meramente aumentar o efeito de fármacos quimioterapêuticos em linhagens celulares MDR imortalizadas.

[0017] Da mesma forma, em um primeiro aspecto da presente invenção, é provido um método para induzir apoptose em células cancerígenas em proliferação para o tratamento ou prevenção de câncer em um mamífero, o método compreendendo a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou um sal farmacologicamente aceitável desta.

[0018] Em um segundo aspecto da presente invenção, é provido um método para induzir apoptose em células cancerígenas em proliferação em um tumor em um

mamífero, o método compreendendo a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

[0019] Em um terceiro aspecto da presente invenção, é provido um método para induzir morte celular em células cancerígenas em um tumor em um mamífero, o método compreendendo a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

[0020] Em um quarto aspecto da presente invenção, é provido um método para induzir morte celular em células cancerígenas para o tratamento ou prevenção de câncer em um mamífero, o método compreendendo a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

[0021] Em um quinto aspecto da presente invenção, é provido um método para a redução do tamanho de um tumor em um mamífero, o método compreendendo a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta, onde a administração reduz o tamanho do tumor pela indução de apoptose em células cancerígenas em proliferação no tumor.

[0022] Em um sexto aspecto da invenção, é provido um método para o tratamento ou prevenção de câncer, o método compreendendo a etapa de administração a um indivíduo necessitando de tal tratamento uma composição compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína.

[0023] O ligante de DNA pode ser qualquer molécula que possa ligar DNA e interferir com o metabolismo de DNA. Por metabolismo de DNA quer-se significar qualquer processo celular pelo qual o DNA é mantido ou no qual o DNA é utilizado e inclui, por exemplo, síntese de DNA e reações de degradação envolvidas na replicação e reparo de DNA, bem como transcrição. Replicação

significa qualquer processo pelo qual sequências de DNA são copiadas. O ligante pode ligar o DNA de forma não específica por meio de interações eletrostáticas, por meio de interações sulco-ligação específicas e/ou por meio de intercalação entre pares de bases. Em realizações específicas, o ligante de DNA é um intercalador de DNA. O intercalador de DNA pode atuar por intercalação de pares de bases por meio do sulco maior do DNA ou sulco menor do DNA e/ou intercalação por rosca.

[0024] O ligante de DNA pode compreender um sistema de anéis plano que facilita a intercalação do DNA permitindo a inserção entre dois pares de bases adjacentes nas fitas duplas do DNA, distorcendo assim a dupla hélice do DNA e/ou impedindo a replicação e/ou transcrição do DNA pela interferência com o desenrolamento, alongamento e/ou ligação do DNA. A interferência com a síntese do DNA em células em proliferação, tais como células cancerígenas, pode desacelerar ou interromper a replicação do DNA e a proliferação celular, interfere no ciclo celular, reduz a viabilidade celular e/ou conduz à morte celular.

[0025] Em casos particulares, os intercaladores de DNA podem iniciar rotas apoptóticas pela inibição da atividade da topoisomerase. Estes intercaladores de DNA podem ser classificados como inibidores de topoisomerase ou venenos de topoisomerase, e podem ser direcionados para a topoisomerase I e/ou topoisomerase II. Estes intercaladores de DNA podem também ligar proteínas de topoisomerase. Preferivelmente, o intercalador de DNA é capaz de ligar e inibir também a atividade da topoisomerase II. Sem se querer ficar ligado à teoria, é proposto que pela formação de um complexo com o DNA e a topoisomerase II em uma célula em proliferação passando por uma síntese de DNA, o DNA e a topoisomerase II se tornam aprisionadas no “complexo clivável”. Isto previne a religação do DNA de fita dupla que foi inicialmente cortado pela topoisomerase para facilitar o desenrolamento. A quebra da fita de DNA endógeno subsequente aciona a resposta de dano de DNA, levando à apoptose. Este modo de ação pode ser facilitado, ou contribuído, pelo fato do

intercalador de DNA estabilizar a quebra da fita dupla e/ou prevenir o reanelamento das duas fitas do DNA.

[0026] Em casos em que o ligante de DNA é um intercalador de DNA, o ligante de proteína da composição da invenção pode contribuir também para o início da rota apoptótica pela interação com o DNA e/ou a topoisomerase.

[0027] O sistema de anéis plano do intercalador de DNA pode compreender dois ou mais anéis fundidos. Preferivelmente os anéis são aromáticos. Os anéis podem ser quaisquer compostos aromáticos de 5 ou 6 membros e podem ser substituídos e/ou heterocíclicos. Um anel aromático substituído é um em que um átomo de hidrogênio no anel é substituído por um outro átomo ou grupo. Um composto aromático heterocíclico é um em que a estrutura do anel compreende carbono e pelo menos um outro átomo, tal como, por exemplo, nitrogênio, oxigênio e/ou enxofre. Por exemplo, o intercalador de DNA pode compreender um anel benzeno e/ou um composto heterocíclico de 6 membros tal como piridina, pirimidina, pirazina, fosfinina, diazina e/ou tiazina. Em outros exemplos, o intercalador de DNA pode compreender um composto heterocíclico de 5 membros tal como pirrol, imidazol, furano, tiazol e/ou tiofeno.

[0028] Em realizações preferidas, o sistema de anéis plano compreende pelo menos um anel piridina, embora o sistema de anéis possa compreender 2 ou mais anéis piridina. O sistema de anéis plano pode compreender três anéis aromáticos fundidos. Os três anéis fundidos podem ser anéis de 5 ou 6 membros. Em uma realização, o sistema de anéis plano compreende três anéis aromáticos de 6 membros fundidos, onde pelo menos um, e preferivelmente dois, dos anéis aromáticos são heterocíclicos. Cada um dos anéis pode ser benzeno, caso em que o sistema de anéis plano pode ser chamado de antraceno. Um ou mais dos anéis benzeno podem ser halogenados, nitrados, sulfonados, alquilados, acilados e/ou substituídos com combinações estericamente permissíveis destes. O intercalador de DNA pode ser um derivado heterocíclico de antraceno, onde pelo menos um dos anéis apresenta uma estrutura de anel compreendendo carbono e pelo menos nitrogênio. Os derivados de antraceno com uma estrutura de anel

compreendendo carbono e um, dois e três nitrogênios pode ser chamados de monozaaantracenos, diazaantraceno e triazaantraceno, respectivamente.

[0029] Exemplos não limitantes de antracenos/ grupos de antraceno que podem fazer parte do intercalador de DNA incluem 1,-monozaantraceno, 2,-monozaantraceno, 5,-monozaantraceno, 1,2-diazaantraceno, 1,3-diazaantraceno, 1,4-diazaantraceno, 1,5-diazaantraceno, 1,6-diazaantraceno, 1,7-diazaantraceno, 1,8-diazaantraceno, 1,9-diazaantraceno, 1,10-diazaantraceno, 2,3-diazaantraceno, 2,5-diazaantraceno, 2,7-diazaantraceno, 2,8-diazaantraceno e 5,10-diazaantraceno. Em realizações preferidas da invenção, o sistema de anéis plano do intercalador de DNA é um 1,5-diazaantraceno (também conhecido como benzo(b)-1,5-natiridina), ou um derivado deste.

[0030] Em realizações preferidas da invenção, o sistema de anéis plano do intercalador de DNA é um antraceno, um diazaantraceno, ou, mais preferivelmente, um 1,5-diaza-antraceno com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em $-O^{(-)}$, $-OH$, $-OR$, $-OC_6H_5$, $-OCOCH_3$, $-NH_2$, $-NR_2$, $-NHCOCH_3$, $-R$, $-C_6H_5$, $-NO_2$, $-NR^{(+)}$, $-PR^{(+)}$, $-SR^{(+)}$, $-SO_3H$, $-SO_2R$, $-CO_2H$, $-CO_2R$, $-CONH_2$, $-CHO$, $-COR$, $-CN$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-CH_2Cl$, $-CH=CHNO_2$, onde R é qualquer grupo alquil.

[0031] O ligante de proteína pode ser qualquer molécula que ligue e interfira com a atividade de uma proteína, e pode impedir qualquer rota de sinalização envolvendo a dita proteína. Deve ser entendido que a comunicação dentro e entre células ocorre por meio de transmissão de sinais por rotas de sinalização (também conhecido como transdução de sinal). Em realizações preferidas da invenção, o ligante de proteína liga uma proteína que está envolvida em uma rota de sinalização que leva, ou aumenta/permite a progressão do câncer. Esta rota de sinalização pode ser qualquer rota que resulte em qualquer (quaisquer) fenótipo(s) associado(s) com câncer, incluindo, mas não se limitando a, proliferação celular, desvio celular da apoptose e/ou necrose, desvio celular da resposta imune, incorporação e propagação do dano de DNA, mobilidade celular aumentada e metabolismo celular aumentado. Pelo bloqueio de uma rota de

sinalização que resulte em fenótipo associado com câncer, o ligante de proteína pode auxiliar no tratamento ou prevenção de câncer pela redução, minimização, reversão, prevenção, retardo ou ablação, ou qualquer efeito do fenótipo associado com câncer.

[0032] O ligante de proteína pode bloquear uma rota de sinalização por ligação a uma proteína e prevenção de uma modificação pós tradução da proteína, tal como reações de clivagem específicas, a formação de ligações dissulfeto, a adição de grupos de baixo peso molecular, por exemplo, por meio de acetilação, amidação, biotinilação, cisteinilação, deamidação, formilação, glutationilação, glicação, glicosilação, hidroxilação, metilação, oxidação, palmitoilação ou fosforilação e/ou conjugações com outros tipos de moléculas. Em outros exemplos, uma rota de sinalização pode ser bloqueada pela ligação do ligante de proteína a uma proteína e prevenção da remoção de grupos de baixo peso molecular adicionados por qualquer um dos processos pós tradução mencionados acima.

[0033] O destinatário qualificado saberia que um dos mecanismos celulares mais comuns de transdução de sinal é a fosforilação de proteínas quinases e defosforilação de proteína por fosfatases. Da mesma forma, em realizações preferidas da invenção, o ligante de proteína bloqueia uma rota de sinalização que leva, ou aumenta/permite a progressão de câncer, pela interferência com o estado de fosforilação de uma proteína na rota de sinalização. Por interferência quer-se dizer que (a) o ligante de proteína pode ligar uma proteína na rota de sinalização e prevenir ou permitir a fosforilação ou defosforilação desta proteína; ou (b) o ligante de proteína pode ligar uma proteína na rota de sinalização e prevenir ou permitir que a proteína fosforilize ou defosforilize outros substratos na rota de sinalização.

[0034] Uma característica particularmente comum do câncer é a atividade aumentada, supraexpressão ou perda de regulação negativa das proteínas quinases, o que pode ser chamado coletivamente de suprarregulação das proteínas quinases. Em realizações preferidas da invenção, o ligante de proteína

liga uma proteína quinase, e mais preferivelmente, o ligante de proteína liga uma proteína quinase que é envolvida em uma rota de sinalização que leva, ou aumente/permita a progressão do câncer. O ligante de proteína pode ligar a proteína quinase e prevenir, perturbar ou reduzir a capacidade da proteína quinase em fosforilar alvos envolvidos na rota de sinalização. A ação da proteína quinase pode ser evitada, perturbada ou reduzida pela ligação do ligante de proteína temporariamente, reversivelmente, permanentemente ou em resposta a estímulos particulares. A ação da proteína quinase pode ser evitada, perturbada ou reduzida pela ligação do ligante de proteína, por exemplo, pelo ligante de proteína que induz alterações conformacionais na proteína quinase, o ligante de proteína ocupando sítios de ligação na proteína quinase, o ligante de proteína bloqueando outros sítios receptores que ordinariamente acionariam eventos de fosforilação e/ou o ligante de proteína criando obstrução estérica à atividade da quinase. Da mesma forma, o ligante de proteína pode ser chamado de um inibidor de proteína quinase.

[0035] O ligante de proteína pode ligar e inibir qualquer proteína quinase que seja suprarregulada em uma rota de sinalização que leve ou aumente/permita a progressão de câncer. Em certas realizações da invenção, a proteína quinase é uma quinase envolvida na rota da MAP (proteína ativada por mitógeno) quinase (também conhecida como a rota da Ras/MAPK ou rota da Ras/Raf/MAPK ou rota da MAP/Erk ou rota da Ras/Raf/Mek/Erk), que é envolvida na proliferação celular, sobrevivência celular e metástase. Em particular, o ligante de proteína pode ligar e inibir uma MEK (MAPK/Erk quinase), pode ligar e inibir uma Raf quinase, ou pode ligar e inibir uma ERK (quinase receptora extracelular) ou isoformas destas.

[0036] Em outras realizações, o ligante de proteína liga uma proteína quinase na rota da PI3K/Akt (fosfoinosítide 3-quinase/Proteína Quinase B) quinase, que é uma combinação de muitas rotas individuais envolvidas na proliferação, metabolismo, sobrevivência celular e resposta a dano de DNA. Em particular, o

ligante de proteína pode ligar e inibir PI3K, Akt, PDK1 , GSK-3, Wee1 , Myt1 , CHK1 , CHK2, ATR, ATM, mTOR, CDK2 ou PIP5K, ou isoformas destes.

[0037] Em um exemplo adicional, o ligante de proteína liga uma proteína quinase na rota da RIPK3/RIPK1 (serina/treonina quinase 3/1 que interage com receptor; também conhecida como rota da RIP1 e/ou RIP3 quinase) quinase, que é envolvida em apoptose e necrose. Em particular, o ligante de proteína pode ligar e inibir RIPK3, RIPK1 , TAK1 ou FADD, ou isoformas destas. Em outros exemplos, o ligante de proteína liga e inibe PKC (proteína quinase C) ou isoformas desta, que é envolvida na proliferação, mobilidade e sobrevivência celular.

[0038] Em realizações da presente invenção, o ligante de proteína é um inibidor da proteína quinase, onde a proteína quinase é selecionada do grupo consistindo em MEK, Raf, ERK, PI3K, Akt, PDK1 , GSK-3, Wee1 , Myt1 , CHK1 , CHK2, ATR, ATM, mTOR, CDK2, PIP5K, RI PK3, RIPK1 , TAK1 , FADD e PCK, e/ou isoformas destas.

[0039] O ligante de proteína pode ligar mais de uma proteína quinase. Da mesma forma, em realizações da presente invenção, o ligante de proteína liga e inibe uma ou mais proteínas quinases selecionadas do grupo consistindo em MEK, Raf, ERK, PI3K, Akt, PDK1 , GSK-3, Wee1 , Myt1 , CHK1 , CHK2, ATR, ATM, mTOR, CDK2, PIP5K, RIPK3, RIPK1 , TAK1 , FADD e PCK, e/ou isoformas destas.

[0040] Em realizações da presente invenção, o ligante de proteína liga a quinase, Glicogênio Sintase Quinase-3 (GSK-3), e pode ser chamado de um ligante de GSK-3. Neste caso, o ligante de proteína pode ser qualquer molécula que se ligue a GSK3 α e/ou GSK3 β , onde deve ser entendido que GSK3 α e GSK3 β são parálogos que apresentam substratos de fosforilação diferentes e sobrepostos e respondem a sinais moleculares diferentes e sobrepostos. Para facilidade de referência, ambas as moléculas serão coletivamente chamadas de GSK-3, embora deva ser entendido que o ligante de GSK-3 pode preferivelmente ligar um dos parálogos, pode ligar os parálogos com diferentes especificidades e

afinidades e/ou pode preferencialmente ligar um dos parálogos, por exemplo, em locais celulares particulares, em resposta a diferentes estímulos e/ou quando sendo utilizados no tratamento ou prevenção de diferentes cânceres. Alternativamente, o ligante de GSK-3 pode ligar cada um dos parálogos no mesmo local com especificidade e afinidade similares.

[0041] A GSK-3 é uma quinase prolífica e promíscua, conhecida como envolvida na promoção de tumor por meio de metabolismo celular aumentado e a formação de complexos de proteína anti-apoptóticos. A GSK-3 está presente por toda a célula, inclusive no núcleo. Da mesma forma, sem se querer estar preso à teoria, é proposto que a interferência da sinalização de GSK-3 em células em proliferação, tais como células cancerígenas, pode romper muitos processos celulares relevantes, desta forma, desacelerando ou interrompendo a proliferação celular e/ou encorajando a morte celular.

[0042] Em uma ou mais realizações, o ligante de proteína pode compreender um ou mais anéis aromáticos de 5 ou 6 membros, onde o anel(is) pode(m) ser substituído(s) e/ou heterocíclico(s). Em outras realizações, o ligante de proteína pode compreender anéis de 5 ou 6 membros que não são aromáticos e os anéis podem ser substituídos em qualquer um dos átomos da estrutura do anel. In realizações da invenção, o ligante de proteína pode compreender um ou mais anéis benzeno ou fenil e estes podem ser halogenados, nitrados, sulfonados, alquilados, acilados e/ou substituídos com combinações estericamente permissíveis destes. Em realizações adicionais, o ligante de proteína pode compreender um ou mais anéis pirrolidina. O ligante de proteína pode compreender um ou mais anéis aromáticos de 6 membros e/ou um ou mais anéis de 5 membros, com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em $-O^{(-)}$, $-OH$, $-OR$, $-OC_6H_5$, $-OCOCH_3$, $-NH_2$, $-NR_2$, $-NHCOCH_3$, $-R$, $-C_6H_5$, $-NO_2$, $-NR_3(+)$, $-PR_3(+)$, $-SR_2(+)$, $-SO_3H$, $-SO_2R$, $-CO_2H$, $-CO_2R$, $-CONH_2$, $-CHO$, $-COR$, $-CN$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-CH_2Cl$, $-CH=CHNO_2$, $-C_2H_5$, $-CR_2H$, $-CR_3$, onde R é qualquer grupo alquil. Em realizações preferidas, o ligante de proteína pode compreender um anel fenil

e um ou mais anéis pirrolidina, o anel fenil e/ou o anel pirrolidina podem ser substituídos com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em $-\text{O}^{(-)}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{OC}_6\text{H}_5$, $-\text{OCOCH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{R}$, $-\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NR}^{(+)}$, $-\text{PR}^{(+)}$, $-\text{SR}_2(+)$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{R}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{R}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}$, $-\text{CN}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}=\text{CHNO}_2$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CR}_2\text{H}$, $-\text{CR}_3$, onde R é qualquer grupo alquil.

[0043] O ligante de proteína pode ligar ou interagir com a proteína em resíduos particulares. Estes resíduos podem, por exemplo, ser parte de um ou mais sítios de ligação ou fosforilação na proteína. Alternativamente, os resíduos podem ser cruciais para a fixação da proteína ou fosforilação de um substrato de proteína.

[0044] Em realizações da invenção, o ligante de proteína pode ligar ou interagir com resíduos específicos na GSK-3. Por exemplo, o ligante de GSK-3 pode ligar um sítio ativo de GSK-3p por meio de uma ligação de hidrogênio à Valina 135, Glutamina 185 e por meio de interações de van der Waals a vários aminoácidos adicionais.

[0045] Nos métodos da presente invenção, o câncer pode ser tratado ou prevenido pela administração de uma composição compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína, onde os ligantes são moléculas separadas. Isto permitiria que a composição compreendesse diferentes proporções molares dos dois ligantes para se localizarem em diferentes partes da célula e/ou se localizarem em conjunto. Por exemplo, a composição pode compreender um excesso do ligante de DNA (isto é, uma proporção molar do ligante de DNA:ligante de proteína de 1000:1 a 1,1:1) ou um excesso do ligante de proteína (isto é, uma proporção molar do ligante de DNA:ligante de proteína de 1:1000 a 1:1,1) ou quantidades molares iguais de ligante de DNA e ligante de proteína. A proporção do ligante de DNA e ligante de proteína pode ser modificada e ajustada dependendo de fatores tais como tipo de câncer sendo tratado, o estágio do câncer, a idade do indivíduo e saúde geral e sensibilidade dos efeitos do ligante de DNA e/ou ligante de proteína.

[0046] Em outras realizações, o ligante de DNA e o ligante de proteína são moléculas separadas que são conjugadas entre si, o que seria tipicamente uma proporção de 1:1, embora os ligantes possam ser conjugados de tal maneira a permitir um excesso do ligante de DNA ou do ligante de proteína. Por exemplo, 1-10 moléculas do ligante de DNA podem ser conjugadas com um único ligante de proteína, ou 1-10 moléculas do ligante de proteína podem ser conjugadas com um único ligante de DNA. Por conjugação quer-se dizer que o ligante de DNA e o ligante de proteína são produzidos separadamente e ligados por um espaçador ou reticulador apropriado e farmacologicamente aceitável ou por interações eletrostáticas ou covalentes, para administração em uma proporção estabelecida. O espaçador ou o reticulador podem ser cliváveis sob certos estímulos ou a conjugação pode ser irreversível.

[0047] Em realizações preferidas da invenção, o ligante de DNA e o ligante de proteína são componentes de um único composto. O ligante de DNA e o ligante de proteína podem ser unidos por um ligante apropriado em um composto único. O ligante pode ser rígido ou flexível e/ou pode ser de qualquer comprimento que facilite o ligante de DNA em ser capaz de ligar DNA e o ligante de proteína em ser capaz de ligar proteína. O ligante não precisa permitir a ligação simultânea de DNA e de proteína, embora isto seja preferido em algumas realizações. O ligante pode compreender um grupo amino. O composto pode compreender outros ligantes e/ou sítios ativos.

[0048] No caso do ligante de DNA e do ligante de proteína serem conjugados ou parte de um único composto, deve ser entendido que isto resultaria na co-localização do ligante de DNA e ligante de proteína. A um dado momento, o composto ou ligantes conjugados podem estar localizados de tal forma que o ligante de DNA ou apenas o ligante de proteína pode ser capaz de ligar DNA ou a proteína, respectivamente. Alternativamente, o composto ou ligantes conjugados podem estar localizados de tal forma que tanto o ligante de DNA quanto o ligante de proteína são capazes de ligar suas respectivas moléculas alvo simultaneamente. A capacidade do ligante de DNA e do ligante de proteína no

composto ou nos ligantes conjugados em ligar DNA e proteína, respectivamente, seja simultaneamente ou sequencialmente pode flutuar no tempo ou em resposta às atividades celulares.

[0049] Em realizações preferidas, o ligante de DNA e o ligante de proteína estão na forma de pironaridina (PND) ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta. A pironaridina apresenta a fórmula química $C_{29}H_{32}ClN_5O_2$ e o nome químico 4-[(7-cloro-2-metoxi-1,5-dihidrobenzo[b][1,5]naftiridin-10-il)imino]-2,6-bis(pirrolidin-1-ilmetil) ciclohexa-2,5-dien-1-ona (previamente, 2-metoxi-7-cloro-10-(3',5'-bis(pirrolin-1-il metil)-4'-hidroxifenilamino)benzo(b)-1,5-naftiridina). A pironaridina é também conhecida como malaridina e benzonaftiridina 7351.

[0050] Em aplicações terapêuticas, a pironaridina é preferivelmente utilizada como um sal de fosfato ou um tetrafosfato de pironaridina, que apresenta a fórmula química $C_{29}H_{44}ClN_5O_{18}P_4$ e o nome químico 4-[(7-cloro-2-metoxi-1,5-dihidrobenzo[b][1,5]naftiridin-10-il)imino]-2,6-bis(pirrolidin-1-ilmetil)ciclohexa-2,5-dien-1-ona;ácido fosfórico.

[0051] O tetrafosfato de pironaridina é um agente antimalárico comum que foi aprovado e tem sido utilizado efetivamente no tratamento de malária por mais de 30 anos. Em tempos recentes, foi determinado que aumenta a atividade antitumoral de alguns fármacos quimioterapêuticos comuns quando direcionados para cânceres resistentes a fármacos múltiplos, embora não tenha sido nunca utilizado separadamente no tratamento ou prevenção de câncer em estudos *in vivo*, nem tenha sido sugerido como uma terapia anticâncer autônoma que possa se direcionar para células em proliferação. Surpreendentemente, foi encontrado por meio da presente invenção que a pironaridina é um agente anticâncer efetivo com um ligante de DNA e um ligante de proteína. Apesar do composto apresentar dois alvos terapêuticos, é geralmente bem tolerado e seguro para uso. Sem se querer ficar ligado à teoria, se tem por hipótese que a pironaridina se direciona seletivamente para células cancerígenas em proliferação para apoptose e interfere com os mecanismos moleculares que podem permitir normalmente

que as células cancerígenas fujam da morte celular. É importante que a pironaridina seja seletiva no direcionamento para células em proliferação, na medida em que reduz os efeitos colaterais que são comumente associados a tratamentos de câncer menos seletivos.

[0052] A pironaridina compreende um ligante de ligação a DNA que é um derivado de antraceno de três anéis benzeno fundidos e um ligante de proteína que compreende um anel aromático de 6 membros e dois anéis de 5 membros. Na pironaridina, o ligante de ligação a DNA é um 1,5-diaza-antraceno substituído, embora em realizações da invenção, o método se baseie em um derivado de pironaridina que pode conter substituintes alternativos em posições nas estruturas dos anéis. Em outros derivados de pironaridina, o ligante de DNA é um derivado heterocíclico de antraceno com nitrogênio presente em diferentes posições nas estruturas dos anéis aromáticos fundidos. É proposto que este aspecto estrutural da pironaridina (isto é, a natureza plana dos três anéis benzeno fundidos) permita que o ligante de DNA de pironaridina atue como um intercalador de DNA para contribuir para o início da apoptose.

[0053] Esta característica está em contraste com outros agentes antimaláricos que foram sugeridos para aumentar a atividade de agentes quimioterapêuticos contra linhagens celulares resistentes, tais como amodiaquina, mefloquina, naftoquina, pamaquina, primaquina, piperaquina, tafenoquina, mepacrina, halofantrina, pironaridina, nitazoxanide e atovaquona. É possível que a ausência de similaridade estrutural entre a pironaridina e estes agentes seja responsável pela funcionalidade diferente da pironaridina (isto é, apenas tratamento de câncer) quando em comparação com os outros agentes antimaláricos (isto é, amplifica o tratamento de câncer em células resistentes pela inibição da autofagia).

[0054] Na pironaridina, a ligação do ligante de proteína compreende um grupo fenil, embora em realizações da invenção, o método se baseie em um derivado de pironaridina que pode apresentar substituintes alternativos em posições alternativas no anel benzeno. Em outros derivados de pironaridina, o ligante de

proteína compreende um anel heterocíclico de 6 membros. Na pironaridina, a ligação do ligante de proteína compreende adicionalmente 2 anéis pirrolidina, embora em realizações da invenção o método se baseie em um derivado de pironaridina que pode apresentar um ou mais anéis pirrolidina substituídos e/ou pode compreender anéis aromáticos de 5 membros ou anéis de 5 membros com outras moléculas além de carbono e nitrogênio na estrutura do anel.

[0055] Em outras realizações preferidas da invenção, o método compreende a administração a um indivíduo necessitando de tal tratamento uma composição compreendendo tetrafosfato de pironaridina.

[0056] No método da invenção, o câncer pode ser qualquer câncer que se apresente como um tumor sólido ou um câncer do sangue (líquido) incluindo, mas não se limitando a, sarcomas, carcinomas, linfomas, leucemia, mielomas e células tumorais em circulação (CTCs). Por exemplo, o carcinoma pode ser o de pâncreas, bexiga, mama, cólon, mesotelioma, rins, fígado, pulmão, incluindo câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não pequena, de cabeça e pescoço, esôfago, vesícula biliar, ovário, estômago, cervical, tireoide, próstata ou de pele. Em general, o câncer será caracterizado por proliferação celular descontrolada.

[0057] Em outros exemplos, o linfoma pode ser linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkins, linfoma não de Hodgkins, linfoma de célula pilosa, linfoma de célula do manto, mieloma, linfoma de Burkett ou um linfoma extranodal do estômago, mama ou cérebro.

[0058] O sarcoma pode, por exemplo, ser fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, condrosarcoma, leiomiosarcoma, sarcoma mesotelial, angiosarcoma, liposarcoma, tumores ósseos e tumores do sistema nervoso central e periférico, incluindo astrocitoma, neuroblastoma, glioma e schwannomas ou outros tumores, incluindo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteossarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratocantoma, câncer folicular da tireoide e sarcoma de Kaposi.

[0059] O mieloma pode ser, por exemplo, mieloma da célula plasmática ou doença de Kahler ou mieloma múltiplo. Em outros exemplos, a leucemia pode ser leucemia mielogenosa, leucemia granulocítica, leucemia linfática, leucemia linfocítica ou leucemia linfoblástica, polycythemia vera ou eritremia.

[0060] Em outros exemplos não limitantes, o câncer pode ser, por exemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, HIV e cânceres relacionados à AIDs, linfoma do SNC primário, câncer anal, tumores carcinoides gastrointestinais, astrocitomas cerebrais, tumores teratoides/rabdoides atípicos, carcinoma da célula basal, câncer do duto biliar, sarcoma osteosarcoma de Ewing, histiocitoma fibroso maligno, glioma cerebral, tumores dos brônquios, tumores cardíacos, tumores embrionários, tumores da célula germinal, colangiocarcinoma, cordoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielogenosa crônica, neoplasmas mieloproliferativos crônicos, câncer colorretal, craniofaringioma, linfoma de célula T cutâneo, micose fungóide, síndrome de Sezary, carcinoma do duto *in situ* (DCIS), câncer uterino, ependimoma, esteseuroblastoma, tumores da célula germinal extragonadais, câncer dos olhos, melanoma intraocular, retinoblastoma, câncer do tubo de falópio, câncer gástrico, tumores estromais gastrointestinais, câncer testicular, câncer hipofaríngeo, câncer labial, bucal e da cavidade oral, câncer da mama masculina, carcinoma da célula de Merkel, carcinoma do trato da linha média com alterações no gene NUT, síndromes da neoplasia endócrina múltipla, síndromes mielodisplásicas, câncer da cavidade nasal e sino paranasal, câncer nasofaríngeo, câncer orofaríngeo, tumores neuroendócrinos pancreáticos, papilomatose, paraganglioma, câncer da paratireoide, câncer do pênis, câncer faríngeo, feocromocitoma, tumores da pituitária, blastoma pleuropulmonar, câncer peritoneal primário, câncer da glândula salivar, tumores vasculares, câncer da uretra, sarcoma uterino, câncer vaginal, câncer vulvar e tumor de Wilms.

[0061] Os métodos da presente invenção podem prevenir, reduzir ou retardar o desenvolvimento de cânceres que, por exemplo, podem normalmente se

desenvolver a partir de metástase de qualquer um dos cânceres mencionados acima. Os métodos podem também prevenir, reduzir ou retardar a recorrência de qualquer um dos cânceres mencionados acima após o tratamento.

[0062] O câncer pode ser também qualquer câncer em que a capacidade proliferativa das células cancerígenas seja modulada por proteína de alguma forma. Em algumas realizações, o câncer pode ser qualquer câncer em que as células cancerígenas supraexpressam proteína. Deve ser entendido que por “supraexpressar” quer-se significar que a célula cancerígena expressa mais proteína que uma célula saudável do mesmo tecido ou tipo de célula. Por exemplo, uma célula cancerígena presente em um tumor de mama seria considerado como supraexpressando uma proteína se, quando em comparação com uma célula de tecido mamário não cancerígena, o nível de expressão da proteína na célula cancerígena presente em um tumor de mama for maior. Os níveis de expressão de proteína em uma célula podem ser determinados pelo técnico no assunto utilizando técnicas bem conhecidas, tais como, mas não se limitando a, QUANTIFICAÇÃO DE mRNA, imunofluorescência e western blotting.

[0063] Embora a composição da invenção possa ser utilizada sozinha para tratar e prevenir efetivamente câncer, em algumas realizações da invenção, o método compreende a administração a um indivíduo necessitando de tal tratamento uma composição compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína e um agente bioativo adicional. O agente bioativo pode ser incluído na composição compreendendo o ligante de DNA e o ligante de proteína ou o agente bioativo pode ser coadministrado com a composição compreendendo o ligante de DNA e o ligante de proteína. Por coadministração quer-se significar que o agente e a composição podem ser administrados ao mesmo tempo ou a composição e o agente podem ser administrados, por exemplo, em momentos alternado ou um antes do outro ou em seguida um do outro\ ou combinação destes (isto é, pré-administração ou pós administração é incluída no termo coadministração). Por exemplo, o agente bioativo pode ser administrado antes da composição e

também a administrado ao mesmo tempo ou pela mesma duração que a composição. Por “mesmo tempo” quer-se significar limitado a um tempo real, mas um período ou duração de tempo. Por exemplo, um agente bioativo pode ser administrado a um indivíduo ao mesmo tempo que uma composição da invenção, pelo que isto significa que o agente bioativo é administrado de acordo com qualquer esquema adequado por um período particular (dias, semanas, meses ou anos), enquanto o indivíduo está recebendo também uma composição da invenção no mesmo esquema ou em um esquema diferente pelo mesmo período particular (isto é, o paciente pode estar recebendo uma dose diária da composição da invenção por três meses, enquanto, durante estes três meses, o indivíduo está recebendo uma dose semanal do agente bioativo).

[0064] O agente bioativo pode ser qualquer composto que apresente atividade biológica no que diz respeito ao câncer, incluindo atividade terapêutica. O agente bioativo pode ser capaz de se ligar ou interagir com as células do câncer. O agente bioativo pode ser qualquer agente, fármaco, composto ou composição que possa ser utilizado para a detecção, prevenção e/ou tratamento de um câncer. Em realizações da presente invenção, o agente bioativo é um agente terapêutico e mais preferivelmente, um agente quimioterapêutico. Em realizações da invenção, o ligante de DNA e o ligante de proteína estão na forma de pironaridina (PND) ou de um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta e o agente bioativo é incluído na composição compreendendo pironaridina, ou o agente bioativo é coadministrado com a composição compreendendo pironaridina.

[0065] Em realizações particularmente preferidas da invenção, o agente bioativo é um agente quimioterapêutico selecionado do grupo consistindo em acetato de Abiraterona, paclitaxel ligado a albumina (nab), Alemtuzumab, Altretamina, Asparaginasa, Bendamustina, Bevacizumab, bleomicina, Bortezomib, Brentuximab vedotin, Busulfano, Cabazitaxel, Capecitabina, Carboplatina, Carmustina, Cetuximab, Clorambucil, Cisplatina, Cladribina, Crizotinib, Ciclofosaamida, Citarabina (Ara-C), Dacarbazina, Dactinomicina, Dasatinib,

Daunorubicina, DaunoXome (daunorubicina lipossômica), DepoCyt (citarabina lipossômica), Docetaxel, Doxil (doxorubicina lipossômica), Doxorubicina, mesilato de Eribulina, Erlotinib, Estramustina, Etoposídeo, Everolimus, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracil, Gefitinib, Gemcitabina, wafers de Gliadel, Hidroxiureia, Ibritumomab, Ibritumomab, Idarubicina, Ifosfamida, Imatinib, Ipilimumab, Irinotecan, Ixabepilona, Lapatinib, Lenalidomida, Lomustina, Mecloretamina, Melfalano, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mioxantrona, MG132, Nilotinib, Oxaliplatina, Paclitaxel, Panitumumab, Pazopanib, Peginterferon alfa-2b, Pemetrexed, Pentostatina, Pralatrexato, Procarbazina, Rituximab, Romidepsina, Ruxolitinib, Sipuleucel-T, Sorafenib, Streptozocina, Sunitinib, Temozolomida, Temsirolimus, Teniposídeo, Talidomida, Tioguanina, Tiotepa, Topotecano, Tositumomab, Trastuzumab, Valrubicina, Vandetanib, Vemurafenib, Vinblastina, Vincristina e Vinorelbina. O técnico no assunto entenderá que esta não é de forma alguma uma lista exaustiva e que outros agentes quimioterapêuticos desenvolvidos no futuro podem ser adequados para uso nos métodos da presente invenção.

[0066] Em realizações mais preferidas da invenção, o ligante de DNA e o ligante de proteína estão na forma de pironaridina (PND), ou de um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta e um agente bioativo é incluído na composição compreendendo pironaridina ou um agente bioativo é administrado em conjunto com a composição compreendendo pironaridina, onde o agente bioativo é selecionado do grupo consistindo em cisplatina, gemcitabina, bortezomib e MG132.

[0067] Em realizações da invenção, o método compreende a administração de uma composição compreendendo dois ou mais agente bioativos.

[0068] Em outras realizações preferidas da presente invenção, o ligante de DNA, ligante de proteína e/ou o agente bioativo adicional é um profármaco. Um profármaco é um fármaco derivado de um fármaco ativo que pode ser inerte ou apresentar toxicidade mais baixa que o fármaco ativo, que pode ser processado ao fármaco ativo *in vivo*. O processamento pode ocorrer por meio enzimático ou

químico e/ou o processamento pode ser acionado por sinais biológicos, tais como alterações no pH e/ou em resposta à ligação a um componente celular.

[0069] Em um outro aspecto da invenção, é provido o uso de um ligante de DNA e um ligante de proteína na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de câncer.

Composições e medicamentos, dosagens e administração

[0070] As composições, compostos e medicamentos da presente invenção podem ser administrados por rotas orais, tópicas ou parenterais, incluindo intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e subcutânea. Podem ser administrados por injeção diretamente em um tumor. Podem ser administrados a órgãos, tecidos e células *ex vivo*.

[0071] Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutâneo e intravenoso, as composições e medicamentos da invenção serão geralmente providos em soluções ou suspensões aquosas estéreis, tamponadas para um pH apropriado e isotonicidade. Veículos aquosos adequados incluem solução de Ringer e cloreto de sódio isotônico. As suspensões aquosas de acordo com a invenção podem incluir agentes de suspensão tais como derivados de celulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona e goma tragacanto e um agente umectante tal como lecitina. Conservantes adequados para suspensões aquosas incluem p-hidroxibenzoato de etila e n-propila.

[0072] Para administração oral, as composições da invenção serão em geral providas na forma de tabletes ou cápsulas ou como uma solução ou suspensão aquosa. Os tabletes para uso oral podem incluir o ingrediente ativo misturado com excipientes farmacologicamente aceitáveis tais como diluentes inertes, agentes de desintegração, agentes ligantes, agentes lubrificantes, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes corantes e conservantes. Os diluentes inertes adequados incluem carbonato de sódio ou de cálcio, fosfato de sódio ou de cálcio e lactose. Amido de milho e ácido algínico são exemplos de agentes de desintegração adequados. Os agentes ligantes podem incluir amido e gelatina. O agente lubrificante, se presente, será em geral o estearato de magnésio, ácido

esteárico ou talco. Se desejado, os tabletes podem ser revestidos com um material tal como monostearato de glicerila ou diestearato de glicerila, de maneira a retardar a absorção no trato gastrointestinal.

[0073] As cápsulas para uso oral incluem cápsulas de gelatina dura nas quais o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido e cápsulas de gelatina mole em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um óleo tal como óleo de amendoim, parafina líquida ou óleo de oliva.

[0074] Para administração tópica, as composições da invenção serão em geral providas na forma de líquido, loção, emulsão, mousse, pasta, creme, unguento ou gel e podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de cânceres da pele ou câncer próximo à superfície da pele, de tal forma que o ligante de DNA e o ligante de proteína são capazes de difundir para as células afetadas. As composições da invenção para administração tópica incluem também agentes conservantes, umectantes, emolientes, hidratantes, fatores de consistência, agentes quelantes, excipientes, diluentes e corantes farmacologicamente aceitáveis.

[0075] As doses efetivas das composições, compostos e medicamentos utilizados na presente invenção podem ser determinadas por métodos convencionais e serão em geral dependentes do agente terapêutico utilizado. O nível de dosagem específico requerido para qualquer indivíduo particular irá depender de um número de fatores, incluindo a severidade da condição sendo tratada, da rota de administração e do peso do indivíduo.

[0076] Por exemplo, 1 dose unitária pode incluir cerca de 0,1 mg a cerca de 10000 mg de um único composto compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína, ou forma(s) alternativa(s), derivado(s), ou sal(is) deste, ou combinações destes e/ou fonte(s) destes descritos em qualquer aspecto e/ou exemplo da invenção. Em um outro exemplo, a dose unitária inclui cerca de 50 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 100 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 200 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 500 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 1000 a cerca de 10000 mg, cerca de 2000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 4000 mg a

cerca de 10000 mg, cerca de 8000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 5 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 10 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 20 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 50 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 100 a cerca de 1000 mg, cerca de 200 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 400 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 0.5 mg a cerca de 100 mg, cerca de 1 mg a cerca de 100 mg, cerca de 2 mg a cerca de 100 mg, cerca de 5 mg a cerca de 100 mg, cerca de 10 a cerca de 100 mg, cerca de 20 mg a cerca de 100 mg, cerca de 40 mg a cerca de 100 mg, ou cerca de 80 mg a cerca de 100 mg. Preferivelmente, a dose unitária inclui cerca de 25 mg, cerca de 100 mg, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, ou cerca de 1000 mg de um único composto compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína, ou forma(s) alternativa(s), derivado(s), ou sal(is) deste, ou combinações destes e/ou fonte(s) deste descritos em qualquer aspecto e/ou exemplo da invenção.

[0077] Em outros exemplos, 1 dose unitária pode incluir cerca de 0,1 mg a cerca de 10000 mg de um ligante de DNA e cerca de 0,1 mg a cerca de 10000 mg de um ligante de proteína, ou formas(s) alternativa(s), derivado(s), ou sal(is) deste, ou combinações destes e/ou fonte(s) deste descritos em qualquer aspecto e/ou exemplo da invenção. Em um outro exemplo, a dose unitária inclui cerca de 50 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 100 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 200 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 500 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 1000 a cerca de 10000 mg, cerca de 2000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 4000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 8000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 5 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 10 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 20 g a cerca de 1000 mg, cerca de 50 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 100 a cerca de 1000 mg, cerca de 200 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 400 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 0.5 mg a cerca de 100 mg, cerca de 1 mg a cerca de 100 mg, cerca de 2 mg a cerca de 100 mg, cerca de 5 mg a cerca de 100 mg, cerca de 10 a cerca de 100 mg, cerca de 20 mg a cerca de 100 mg, cerca de 40 mg a cerca de 100 mg, ou cerca de 80 mg a cerca de 100 mg de um

ligante de DNA, e cerca de 50 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 100 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 200 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 500 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 1000 a cerca de 10000 mg, cerca de 2000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 4000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 8000 mg a cerca de 10000 mg, cerca de 5 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 10 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 20 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 50 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 100 a cerca de 1000 mg, cerca de 200 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 400 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg, cerca de 0.5 mg a cerca de 100 mg, cerca de 1 mg a cerca de 100 mg, cerca de 2 mg a cerca de 100 mg, cerca de 5 mg a cerca de 100 mg, cerca de 10 a cerca de 100 mg, cerca de 20 mg a cerca de 100 mg, cerca de 40 mg a cerca de 100 mg, ou cerca de 80 mg a cerca de 100 mg de um ligante de proteína. Preferivelmente, a dose unitária includes cerca de 25 mg, cerca de 100 mg, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, ou cerca de 1000 mg de um ligante de DNA e cerca de 25 mg, cerca de 100 mg, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, ou cerca de 1000 mg de um ligante de proteína, ou formas(s) alternativa(s), derivado(s), ou sal(is) deste, ou combinações destes e/ou fonte(s) deste descritos em qualquer aspeto e/ou exemplo da invenção.

[0078] A dose unitária pode ser administrada uma, duas, três, quatro ou cinco vezes ao dia ou pode ser administrada a cada segundo ou terceiro dia ou uma vez por semana, uma vez a cada dois meses ou uma vez a cada quatro meses.

[0079] Em algumas realizações, as composições, compostos e medicamentos podem ser administrados a um indivíduo isoladamente ou em combinação com outro(s) agente(s) bioativo(s) adicional(is). Em tais realizações, a administração pode ser simultânea ou sequencial.

[0080] Tipicamente, em aplicações de tratamento, as composições, compostos e medicamentos podem ser administrados pela duração do câncer. Além disto, será claro a um técnico no assunto que a quantidade e o espaçamento ótimos de

dosagens individuais podem ser determinados pela natureza e extensão da doença ou condição sendo tratada, da forma, rota e local de administração e da natureza do indivíduo particular sendo tratado. As dosagens ótimas podem ser determinadas pela utilização de técnicas convencionais.

[0081] Algumas realizações da presente invenção podem envolver a administração da composição ou medicamento em doses múltiplas separadas. Da mesma forma, os métodos de tratamento e prevenção descritos aqui englobam a administração de doses múltiplas separadas a um indivíduo, por exemplo, por um período definido de tempo.

[0082] As composições e medicamentos desta invenção podem ser também úteis em combinação (administrados em conjunto ou separadamente) com um ou mais agentes terapêuticos adicionais tais como terapia por radiação e/ou um ou mais agentes terapêuticos adicionais selecionados do grupo consistindo em diferentes tipos de fármacos quimioterapêuticos, antibióticos antitumorais, inibidores de topoisomerase, inibidores mitóticos, corticosteroides, terapias direcionadas, agentes de diferenciação, terapia hormonal e imunoterapia.

Definições

[0083] A não ser que o contexto claramente requeira de forma diferente, por todo o relatório e reivindicações, as palavras “compreende”, “compreendendo” e semelhantes devem ser consideradas no sentido inclusivo em oposição a um sentido exclusivo ou exaustivo; isto quer dizer, no sentido de “incluindo, mas não limitado a”.

[0084] O termo "tratamento", e semelhantes, no contexto do presente relatório inclui o alívio dos sintomas associados com um câncer, regressão e/ou remissão do câncer. Em certas realizações, um tratamento irá desacelerar, retardar ou interromper a proliferação de células cancerígenas, ou metástase de um câncer, desacelerar, retardar ou interromper o aumento do tamanho de um tumor eu ocorreria normalmente a partir da proliferação celular no tumor, prevenir a diferenciação de uma linhagem celular, reduzir o tamanho do tumor ou reverter a progressão de um ou mais tumores, pelo menos temporariamente. O tratamento

pode curar o câncer, ou retardar a morbidez. Desta forma, no contexto desta invenção, a palavra "tratamento" ou suas derivadas quando utilizada em relação a uma aplicação terapêutica inclui todos os aspectos de uma terapia, tal como o alívio de dor associada com o câncer sendo tratado, alívio da severidade do câncer sendo tratado, melhora de um ou mais sintomas do câncer sendo tratado, melhora no bem estar global do indivíduo sendo tratado. O uso da palavra "tratamento" ou suas derivadas será entendido como significando que o indivíduo sendo "tratado" pode experimentar qualquer um ou mais dos benefícios mencionados acima. Em geral, o tratamento pode estar relacionado à morte das células em proliferação presentes no câncer.

[0085] O termo "prevenção", e semelhantes, no contexto do presente relatório refere-se à prevenção da recorrência de todos ou alguns dos sintomas associados com um câncer após a remissão do dito câncer, bem como a prevenção da formação de um ou mais cânceres devidos, por exemplo, à metástase de um câncer. A prevenção pode evitar a morbidez devido a um ou mais cânceres, ou retardar a morbidez devida a um ou mais cânceres. Em geral, a prevenção pode estar relacionada à morte das células em proliferação que podem causar um câncer ou causar a disseminação ou recorrência de um câncer.

[0086] No contexto deste relatório o termo "cerca de" será entendido como indicando as tolerâncias usuais que um técnico no assunto irá associar com o dado valor.

[0087] No contexto deste relatório, onde é indicada uma faixa para um parâmetro, deve ser entendido que o parâmetro inclui todos os valores dentro da faixa indicada, inclusive dos pontos de extremidade indicados da faixa.

[0088] No contexto da presente invenção, o termo "indivíduo" refere-se a um animal, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um humano, que tenha experimentado e/ou tenha exibido pelo menos um sintoma associado com um câncer. Tipicamente, o indivíduo é uma pessoa apresentando câncer e está sob cuidados clínicos de um médico. O indivíduo pode ser humano ou pode ser um não humano, de tal forma que a referência a um indivíduo significa um

humano ou um não humano, tal como um indivíduo de qualquer espécie de importância social, econômica ou pesquisa incluindo, mas não se limitando a, membros das classificações de ovino, bovino, equino, porcino, felino, canino, primatas, roedores, especialmente membros domesticados destas classificações, tais como ovelhas, gado, cavalos e cães. Além disto, tal como utilizado aqui, um “indivíduo necessitando de tal tratamento” pode adicionalmente ser um indivíduo que não tenha exibido quaisquer sintomas de um câncer, mas que tenha sido considerado por um médico, clínico ou outro profissional de medicina como sob o risco de desenvolver câncer. Por exemplo, o indivíduo pode ser considerado em risco de desenvolver câncer (e, desta forma, em necessidade de prevenção ou tratamento preventivo) como uma consequência do histórico médico do indivíduo, incluindo, mas não se limitando a, histórico familiar, predisposição, câncer coexistente/contribuidor.

[0089] No contexto da presente invenção, por “excipiente ou diluente farmacologicamente aceitável” quer-se significar qualquer excipiente ou diluente que não seja biologicamente indesejável, isto é, o material pode ser incorporado em uma composição farmacêutica da presente invenção e administrado a um indivíduo sem causar quaisquer efeitos biológicos indesejáveis ou indevidos, incluindo, mas não se limitando a, toxicidade, incompatibilidade, instabilidade, irritação, resposta alérgica e semelhantes indesejáveis ou indevidas. Em uma realização preferida, o excipiente ou diluente é aprovado por uma agência reguladora ou corpo regulador, (a agência reguladora ou corpo regulador sendo, por exemplo, de Governo Federal ou Estadual), ou listado na U.S. Pharmacopoeia ou outra farmacopeia reconhecida para uso em indivíduos.

Breve Descrição das Figuras

[0090] As realizações da invenção serão agora descritas apenas por meio de exemplos, com referência às figuras anexas, para as quais as legendas são providas abaixo:

Figura 1. A estrutura química do tetrafosfato de pironaridina (PND).

Figura 2. Análise da transcrito de possíveis rotas ativadas pela pironaridina (PND).

Sub-redes para a maioria dos genes suprarregulados (quadrados marcados) em resposta ao tratamento com PND de células HL-60. A análise da correlação de Pearson da assinatura transcricional da PND em comparação com as assinaturas depositadas no projeto LINCS. Os compostos marcados estão correlacionados com os efeitos da PND, e quanto mais escuros no preenchimento, melhor a correlação.

Figura 3. Análise da transcrito de possíveis rotas ativadas pela pironaridina (PND) e validação do alvo. (A)

Sub-redes para a maioria dos genes suprarregulados (quadrados marcados) em resposta ao tratamento com PND de células MDA-MB-231. análise da correlação de Pearson da assinatura transcricional da PND em comparação com as assinaturas depositadas no projeto LINCS. Os compostos marcados estão correlacionados com os efeitos da PND, e quanto mais escuros no preenchimento, melhor a correlação. **(B)** A análise SDS-PAGE revela que a PND causou a inibição da atividade da topoisomerase II em uma maneira dependente da dose. A Pista 1, DNA (kDNA) de cinetoplasto catenado; Pista 2, kDNA descatenado; Pista 3, kDNA linear; Pista 4, kDNA mais topoisomerase II; Pista 5, kDNA mais topoisomerase mais 5 μM de PND; Pista 6, kDNA mais topoisomerase mais 50 μM de PND; Pista 7, kDNA mais topoisomerase mais 500 μM de PND; Pista 8, kDNA mais topoisomerase II mais 1 μM etoposídeo (inibidor Topo II); Pista 9, kDNA mais topoisomerase II mais PBS; Pista 10, kDNA mais topoisomerase II mais DMSO.

Figura 4. Estudos do acoplamento molecular de PND. Interação prevista de resíduos de aminoácidos de PND e quinacrina na Glicogênio Sintase Quinase 3 β (A), e interação de PND especificamente dentro do bolso de ligação previsto de GSK3 β (B).

Figura 5. Concentração Citotóxica de 50% (CC₅₀) de PND e Índice de Citotoxicidade Seletiva (SCI) em um painel de linhagens celulares humanas.

O SCI foi calculado como se segue: $SCI = CC_{50}$ de células não cancerígenas/ CC_{50} de células cancerígenas.

Figura 6. Curvas representativas dose-resposta de PND utilizadas para determinar os valores de CC_{50} . Para estas análises, as células foram expostas por 72 h à PND e sua viabilidade foi determinada por meio do ensaio DNS. Como um exemplo, MDA-MB-231 (A) e HL-60 (B) foram tratadas com um gradiente de concentração de PND como indicado no eixo x; no eixo y é mostrada a percentagem de citotoxicidade (células mortas). Nesta série de experimentos vários controles foram incubados: o diluente de PND, PBS, como contido nas amostras experimentais (0,5% v/v); como um controle negativo, células não tratadas; e como um controle negativo da citotoxicidade, 1 mM de H_2O_2 . Cada ponto experimental representa a média de quatro réplicas e barras de erro mostram seus desvios padrão correspondentes. A concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) em unidades micromolares (μM) é definida como a concentração de PND requerida para romper a membrana plasmática de 50% da população celular após 72 h de incubação.

Figura 7. A PND provocou a externalização de fosfatidilserina em células cancerígenas MDA-MB-231 (A) e HL-60 (B) após 24 h de incubação. O mecanismo de morte celular foi estudado após marcação dupla das células com anexina V-FITC e PI e monitorado por meio de citômetro. (A-B) As percentagens totais de células passando por apoptose (eixo y) são expressas como a soma tanto do estágio inicial quanto do estágio final da apoptose (barras verdes); enquanto células marcadas apenas com PI, sendo anexina V-FITC negativas, foram contadas como população de células necróticas (barras pretas). O cálculo de dois testes t pareados de Student bicaudais de células tratadas com PND em comparação com células de controle tratadas com PBS (*) e não tratadas (‡), proveu valores consistentes de $P < 0,001$, em ambas as circunstâncias. Cada barra representa a média de triplicatas e as barras de erro representam o desvio padrão. A PND infligiu seu efeito citotóxico por meio da despolarização da membrana mitocondrial nas células MDA-MB-231 (C) e HL-

60 (D). As células foram tratadas com PND por 6 h e as alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foram monitoradas por sua marcação com JC-1; um reagente de fluorocromo lipofílico formador de agregado e examinadas por citometria de fluxo. O reagente JC-1 emite um sinal fluorescente verde após despolarização mitocondrial. (C-D) São mostradas as percentagens de células que irradiam sinal fluorescente verde, eixo y, *versus* diferentes tratamentos, eixo x. Como um controle positivo de perturbador do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), foi utilizado 1 mM de H₂O₂. Cada barra representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o desvio padrão. Além disto, a análise de dois testes t pareados de Student bicaudais de células tratadas com PND, em comparação com células de controle tratadas com PBS (*) e não tratadas (‡), proveu valores consistentes de $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente.

Figura 8. PND perturbou o perfil de ciclo celular de duas células cancerígenas, MDA-MB-231 (A-D) e HL-60 (E-H), e exibiu também fragmentação de DNA induzida por apoptose em um modo dependente de dose. Após 72 h de tratamento com PND, foram coletadas células em placas de cultura de 24 poços, fixadas, permeabilizadas, marcadas com DAPI e analisadas por meio de citometria de fluxo. As percentagens para cada uma das fases do ciclo celular são apresentadas ao longo do eixo y, enquanto os diferentes tratamentos são mostrados ao longo do eixo x. Para esta série de experimentos, foram envolvidos os seguintes controles: foi utilizado 1 mM de H₂O₂ como agente perturbador do ciclo celular; 0.1% de PBS como um veículo/solvente de controle; e células não tratadas. Cada barra indica uma média de três réplicas e as barras de erro indicam os correspondentes desvios padrão. Para a obtenção do dados de ensaio e propósitos de análise, o detector FL 9 detector, uma porta de célula única e o software de citometria de fluxo de Kaluza (Beckman Coulter) foram utilizados.

Figura 9. A PND provocou o retardo da migração de DNA de maneira dependente de dose. Três concentrações diferentes tanto de PND quanto de

quinacrina foram incubadas individualmente com 100 ng de DNA plasmidial e o potencial da formação dos complexos foi analisado por meio de uma eletroforese em gel de agarose. Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão Tris/acetato/EDTA e marcados com brometo de etídio. Tanto o PI quanto o DNA plasmidial livre foram utilizados como controles positivos e negativos da mobilidade do DNA, respectivamente. Os poços de carga estão localizados na parte de cima da imagem indicados por duas setas de ponta azul (esquerda superior e cantos à direita). A linha tracejada amarela indica a mobilidade máxima do DNA superenrolado livre utilizado como uma referência. Três trocas de mobilidade de DNA são indicadas pelas linhas e setas azuis (lado esquerdo da imagem). Também, a direção de migração do DNA é indicada por uma seta (lado direito da imagem); a partir do catodo (negativo) para o anodo (positivo). É mostrada uma imagem representativa utilizada para revisar a formação potencial de complexos de DNA complexes.

Figura 10. O DNA de Timo de Bezerro provocou um efeito hipocrômico e batocrômico nos máximos de absorbância de PND. Titulação espectrofotométrica de UV-Visível (300-650 nm) de PND (22,8 μ M) em tampão Tris/HCl após adições sucessivas de DNA (10,1 mM) de Timo de Bezerro (CT). A seta indica as alterações de espectro quando DNA é adicionado. (B) Resumo dos dados da titulação de UV-Visível a partir da interação PND e DNA de CT.

Figura 11. A PND induziu um aumento na intensidade das bandas positiva e negativa do espectro de dicroísmo circular do DNA de Timo de Bezerro. As alterações no espectro de dicroísmo circular (CD) do DNA de Timo de Bezerro (CT). DNA de CT (150 μ M) em tampão Tris/HCl foi submetido a análise de CD após 30 min (A) ou 20 h (B) de incubação com PND a proporções molares de 0,03, 0,06, 0,2 e 0,3. As setas especificam as alterações de espectro de CD do DNA de CT sob um gradiente crescente de concentrações de PND. Os brancos nos espectros de CD com o mesmo gradiente de concentrações de PND na ausência de DNA de CT incubado por 20 h (C). Miligras = mdeg.

Figura 12. O tratamento com PND de camundongos resultou em uma redução do crescimento de tumor. Tumores de câncer de mama metastáticos cresceram maiores em média nos camundongos de controle (750 mm^3) que nos camundongos tratados com PND (430 mm^3) e a diferença foi significativa a partir do Dia 1 para o Dia 15, valores P do teste f de 0,01. Em (A), os Dias 1-9 são barras individuais (esquerda para a direita) para cada camundongo.

Figura 13. O tratamento com PND aumenta a atividade de fármacos quimioterapêuticos em doses baixas em linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231.

Exemplo 1 – Análise de transcriptoma

[0091] Uma análise de transcriptoma foi realizada para comparar os efeitos de PND com assinaturas de fármacos conhecidos, pela utilização de diferentes linhagens celulares.

[0092] Células HL-60 (400000 células/2 ml/poço em uma placa de 6 poços) foram tratadas com $5,6 \mu\text{M}$, ou solvente de PBS de controle por 6 horas. O RNA foi extraído no dia seguinte e submetido a análise de transcriptoma total na instalação do núcleo de Análise Genética da Universidade do Texas em El Paso. Um total de três repetições biológicas foi conduzido para cada tratamento.

[0093] Células MDA-MB-231 foram tratadas com o dobro da concentração CC_{50} de PND, ou solvente de PBS de controle, por 6 horas. O RNA foi extraído no dia seguinte e submetido à análise de transcriptoma total.

[0094] De maneira a explorar o possível Mecanismo de Ação (MoA) da PND, os resultados da transcriptoma para cada linhagem celular obtidos foram comparados com aos dados de expressão genética do projeto LINCS (<http://www.lincsproject.org>), que contém os perfis de expressão genética de várias células humanas tratadas com compostos aprovados e retirados pela FDA, bem como diferentes reagentes químicos bem caracterizados. Foi imaginado que ao perfil de expressão de cada composto deveria induzir também uma expressão genética celular consistente com um MoA conhecido de fármacos depositados no LINCS. Pela utilização desta abordagem, a assinatura de células

tratadas com PND era comparável a cada um dos 476251 perfis de assinatura genômica no LINCS. Os resultados mostrados nas Figuras 2 e 3A sugerem que a PND pode ser um inibidor de GSK e inibidor de topoisomerase, respectivamente. A atividade da PND como um inibidor de topoisomerase foi confirmada pela utilização de um Kit de Ensaio TopoGen Topoisomerase II e os resultados podem ser vistos na Figura 3B.

Exemplo 2 – Acoplamento de GSK-3

[0095] A estrutura cristalina da GSK foi obtida do Protein Data Bank (50Y4) e utilizada para modelar as interações com PND e Quinacrina (ver Figura 4A). É mostrado que a PND interage especificamente dentro do bolso de ligação previsto de GSK3 β (ver Figura 4B). Os experimentos de acoplamento foram realizados pela utilização de GLIDE 5.0 dentro do pacote do Software Schrodinger. Os estudos de acoplamento molecular revelaram que a PND pode interagir com a GSK3 β com um alto escore de acoplamento (-9,4 Kcal/mol) enquanto SB 216763 (do Exemplo 1; ver Figura 2) apresenta um escore similar (-9,2 Kcal/mol)). A quinacrina mostrou baixos escores de ligação de -7,6 Kcal/mol, indicando que o grupo lateral da PND provavelmente provê contatos adicionais entro do bolso de ligação (ver Figura 4A) o que permite que esta se lique melhor à GSK-3.

Exemplo 3 – Análise da toxicidade de PND sobre células cancerígenas de mama humana e hematológicas

[0096] O fármaco pironaridina (PND) é um derivado de benzonaftiridina inicialmente sintetizado em 1970 no Institute of Chinese Parasitic Disease e tem sido utilizado na China por mais de 30 anos para o tratamento de malária. Relatórios anteriores indicaram que a PND inibe a formação de β -hematina promovendo a lise de células vermelhas do sangue induzida por β -hematina co base em estudos de *Plasmodium falciparum* K1 realizados *in vitro*. Em adição, a PND foi previamente testada em combinação com doxorubicina (DOX) em células cancerígenas (MDR) K562/A02 e MCF-7/ADR resistentes a fármacos múltiplos e foi encontrado que aumenta a sensibilidade das células à

doxorubicina. No entanto, nunca foi determinado ou sugerido que a PND apresentava um efeito por si só no tratamento de câncer.

Materiais e Métodos

Preparação de tetrafosfato de pironaridina-PND

[0097] Uma solução estoque de tetrafosfato de pironaridina (PND; 2-metoxi-7-cloro-10[3,5-bis(pirrolidinil-1-metil-)-4-hidroxifenil]aminobenzil-(b)-1,5-naftiridina; APEX-BIO, Houston, TX, USA) e diluições de PND foram preparadas novas pela utilização da Solução Salina Tamponada de Fosfato da Dulbecco (PBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) como solvente. Tanto as soluções estoques quanto suas diluições foram adicionadas diretamente aos poços contendo células em meio de cultura. A estrutura química do tetrafosfato de pironaridina é mostrada na Figura 1.

Linhagens celulares e condições de cultura

[0098] Neste estudo, 19 linhagens celulares humanas foram utilizadas: sete de câncer de mama; MDA-MB-468, MCF-7, T47D, HCC1419, HCC70, MDA-MB-231 (triplo negativo) e seus derivados metastáticos de pulmão (LM) MDA-MB-231 LM2; quatro células de leucemia/linfoma humanas, HL-60, Ramos, Jurkat e CEM, três cânceres de ovário humano, Ovar 8, Ovar 5 e Ovar 3, um câncer de pulmão, um melanoma e uma linhagem de células pancreáticas, A549, A375, Panc-1, respectivamente. Além disto, para propósitos de seletividade/comparação, as linhagens celulares de origem não cancerígena, MCF-10A, HS-27 foram também incluídas. O meio de cultura utilizados para MDA-MB-231, MDA-MB-231 LM2, MDA-MB-468, MCF-7, A549, A375, Panc-1 e HS-27 foi DMEM (Hyclone, Logan UT), enquanto para T47D, HCC-1419, HCC-70, HL-60, Ramos, Jurkat, CEM, Ovar 8 e Ovar 5 foi RPMI-1640 (Hyclone, Logan UT). Consistentemente, tanto o meio de cultura DMEM quanto o RPMI foram suplementados com 10% de soro fetal bovino desativado por calor (FBS: Hyclone), 100 U/ml de penicilina e 100 pg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). As células MCF-10A foram crescidas em DMEM/F12 suplementado com 10% de FBS, 10 pg/ml de insulina

recombinante humana (Sigma), 0,5 pg/ml de hidrocortisona (Sigma), 20 ng/ml de fator de crescimento epidérmico, 2,5 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 pg/ml de estreptomicina. Também, uma ligeira modificação do meio de cultura para as linhagens celulares HL-60 e Ovc3 foi que 20% de FBS foi adicionado ao meio (ATCC, Manassas, VA, USA). Em adição, as células Ovc3 requereram 10 pg/ml de insulina recombinante humana (Sigma). As células aderentes, crescendo na fase de crescimento logarítmica a uma confluência de 60-75%, foram destacadas pela utilização de uma enzima HyQtase (Thermo Fisher Scientific Inc.), contadas e semeadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 10000 em 100 pL de meio de cultura por poço. As células em crescimento em suspensão foram processadas de maneira similar à descrita acima exceto pela adição de HyQtase. Tipicamente, as condições de incubação de todas as células foram de 37°C em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

Ensaio de Marcação Nuclear Diferencial para quantificar a morte celular

[0099] De maneira a analisar a atividade citotóxica potencial da PND, o ensaio de Marcação Nuclear Diferencial (DNS), o qual foi validado para a triagem de alto rendimento (“high-throughput screening” - HTS) utilizando formação de imagem biológica de célula viva. Para este ensaio, as células foram semeadas a uma densidade de 10000 células/poço em uma placa de 96 poços em 100 µl de meio de cultura, incubadas durante a noite e tratadas com concentrações em gradiente de PND por 72 h. duas horas antes da formação de imagem, dois intercaladores de ácido nucleico fluorescentes foram adicionados a cada poço, Hoechst 33342 e iodeto de propídio (PI; Invitrogen); a uma concentração final de 1 µg/ml cada. Devido à sua alta permeabilidade, o Hoechst marca todas as células (mortas e vivas), enquanto o PI marca apenas células mortas ou em processo de morte. Foram capturadas montagens de imagens 2 x 2 diretamente de cada poço individual das placas de cultura pela utilização de um analisador leitor de placa de poços múltiplos IN Cell 2000, um sistema de HTS e análise de alto conteúdo (HCA) (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Os

seguintes controles foram incluídos em cada placa única: PBS como solvente/veículo de controle, peróxido de hidrogênio como um controle positivo para citotoxicidade e células não tratadas para determinar o plano de fundo da toxicidade devida à manipulação celular e fatores intrínsecos associados com o protocolo de cultura. Cada ponto de dado experimental, bem como controles, foi avaliado em triplicatas. Os valores da concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foram calculados com base em uma equação de interpolação linear. A CC_{50} é definida como a concentração de PND requerida para romper a integridade da membrana plasmática de 50% da população de células, em comparação com células tratadas com solvente.

Cálculo do índice de citotoxicidade seletiva

[0100] O índice de citotoxicidade seletiva (SCI) indica a capacidade de um dado composto experimental em matar células cancerígenas mais eficientemente enquanto causando toxicidade mínima a células de origem não cancerígena. Desta forma, o SCI para PND foi calculado como se segue: $SCI = CC_{50}$ de células não cancerígenas/ CC_{50} de células cancerígenas.

Análise da externalização de fosfatidilserina por meio do ensaio de anexina V/PI

[0101] De maneira a determinar se a morte celular induzida por PND ocorre por meio de apoptose ou necrose, células MDA-MB-231 e HL-60 foram marcadas com anexina V-FITC e PI e monitoradas por meio de citometria de fluxo. As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 100000 para células MDA-MB-231 e 200,000 HL-60 aderentes em 1 ml de meio de cultura. Após incubação por uma noite, as células foram tratadas com PND e incubadas por mais 24 h. Para as células MDA-MB-231, as células não fixadas foram coletadas em um tubo gelado, enquanto as células aderentes foram destacadas pela utilização de HyQtase (Thermo Fisher) e incubadas por em torno de 5 min a 37°C. Tanto as células não fixadas quanto as células destacadas coletadas de cada poço individual foram lavadas com PBS gelado e centrifugadas a 260 xg por 5 min. As células HL-60 foram centrifugadas diretamente após o período de incubação conforme cresciam em suspensão. As células foram então marcadas

com uma mistura de anexina V-FITC e PI em 100 µl de tampão de ligação e incubadas em gelo no escuro por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante (Beckman Coulter). Finalmente, as células foram novamente suspensas pela adição de 400 µl de tampão de ligação gelado e analisadas por citometria de fluxo (Cytomics FC500; Beckman Coulter). Para esta série de experimentos, as células foram tratadas com PBS, como solvente de controle; tratadas com H₂O₂, como um controle positivo de citotoxicidade; e as não tratadas foram incluídas e processadas em paralelo. Para cada amostra, 10000 eventos/células foram coletadas e analisadas pela utilização do software CXP (Beckman Coulter). Tanto as amostras experimentais quanto seus controles foram processadas e avaliadas em triplicata. A soma dos estágios precoce e final da apoptose foi calculada para se obter a percentagem de células apoptóticas.

Análise policromática do potencial da membrana mitocondrial

[0102] Células MDA-MB-231 e HL-60 foram semeadas como descrito na seção anterior e tratadas com PND por 7 h. Após o tratamento, as células foram coletadas e marcadas com 2 µM do fluoróforo iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1) seguindo-se as instruções do fabricante (MitoProbe; Life Technologies, Grand Island, NY, USA). As células com mitocôndria polarizada saudável favorecem que o JC-1 forme agregados que emitem um sinal vermelho. As células que apresentam uma mitocôndria despolarizada exibem um sinal verde, devido aos monômeros de JC-1 dispersos. Controles similares ao acima foram analisados concorrentemente. A obtenção e análise dos dados foram realizadas pela utilização do software CXP (Beckman Coulter). Cada ponto de dado foi analisado em triplicata.

Análise das transições entre as fases do ciclo celular

[0103] Culturas assíncronas na fase de crescimento exponencial de células MDA-MB-231 e HL-60 em placas de 24 poços foram tratadas com várias doses de PND. Após 72 h de incubação as células foram centrifugadas e tratadas como na seção anterior, fixadas, permeabilizadas e marcadas com um fluoróforo intercalador de DNA, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); estas três etapas foram

realizadas pela adição às células 200 µl de uma solução de meio de isolamento nuclear único (NIM)-DAPI (Beckman Coulter). A suspensão celular foi então incubada por mais 3 min à temperatura ambiente no escuro. Os controles incluídos na série de experimentos eram similares aos descritos para os experimentos acima. Aproximadamente, 20000 eventos/células foram coletadas por amostra pela utilização de um citômetro de fluxo equipado com um laser de 405 nm de estado sólido (Gallios; Beckman Coulter). A obtenção e distribuição das subpopulações de células dentro de cada ciclo celular foram realizadas pela utilização do software de citometria de Kaluza (Beckman Coulter). Adicionalmente, as duplicatas foram eliminadas efetivamente pela inclusão de uma porta de células únicas no protocolo de obtenção de ciclo celular.

Ensaio de mobilidade de DNA

[0104] Tipicamente, um composto experimental que se intercala ou se liga a DNA de fita dupla (ds) irá aumentar a massa molecular resultante da formação de complexos, reduzindo sua mobilidade eletroforética em um gel de agarose, em comparação com dsDNA não tratado. De maneira a se explorar a interação potencial entre PND e dsDNA, um ensaio de troca de mobilidade de DNA foi conduzido. Cada mistura reacional era de 10 ml de volume total em PBS pH 7,4. Tanto PND (Sigma-Aldrich) quanto quinacrina (Sigma-Aldrich) foram testadas com três concentrações individuais de 1 µM, 0,5 µM ou 0,25 µM, respectivamente. A cada mistura reacional, foram adicionados 100 ng de dsDNA plasmidial (pCMV-dR8.91; Addgene, Cambridge, MA) e a mistura foi então incubada por 30 min a 37°C e interrompida pela adição de 2 ml de tampão de carregamento de gel 6X e colocada em gelo. A interação de ligação potencial entre tanto a PND quanto a quinacrina com dsDNA foi analisada pela utilização de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dissolvido em tampão TAE (0,04 M de Tris base, 0,04 M de acetato e 0,001 M de EDTA) pH 8,0. Para marcar os complexos de dsDNA, foi adicionado brometo de etídio ao gel de agarose por todo o processo de eletroforese a uma concentração de 0,5 µg/ml. A migração do DNA foi visualizada pela utilização de um sistema de documentação de gel e

fotografias foram capturadas pela utilização de um iluminador trans de luz UV (Alpha Innotech, San Leandro, CA). O composto intercalador de DNA fluorescente bem conhecido, iodeto de propídio (PI), foi incluído como controle positivo a 1 µg por reação. Como um controle, DNA plasmidial não tratado foi incluído para determinar sua mobilidade eletroforética normal no gel.

Análise da interação de PND com DNA de Timo de bezerro por espectroscopia de UV-Visível

[0105] As medições de UV-Visível foram obtidas em um espectrofotômetro Varian Cary 100. DNA de Timo de bezerro (CT) e tampões foram adquiridos da Sigma Aldrich. A constante de ligação da PND com DNA de CT foi determinada por titulação por absorção à temperatura ambiente por meio da adição escalonada de uma solução de DNA de CT (10,1 mM; adições de 5 µl) em tampão (5 mM de Tris/HCl, 50 mM de NaCl, pH = 7,39) em uma solução de trabalho de 2 ml de PND (22,8 µM) no mesmo tampão. Os espectros de absorção foram registrados a 424 nm e a titulação foi terminada quando foi atingida a saturação. De maneira a se determinar a afinidade de ligação, os dados foram ajustados para a equação de Scatchard $r/C_f = K(n-r)$ (plotagens de McGhee e von Hippel), onde r é o número de moles de PND ligada a 1 mol de DNA de CT, n é o número de sítios de ligação equivalentes e K é a afinidade do complexo para estes sítios de ligação. Foram calculadas as concentrações dos complexos livres (C_f) e ligados (C_b) a partir de $C_f = C(1-\alpha)$ e $C_b = C-C_f$, respectivamente, onde C é a concentração total de PND. A fração do complexo ligado (α) foi calculada a partir de $\alpha = (A_f - A)/(A_f - A_b)$, onde A_f e A_b são as absorbâncias do fármaco livre e totalmente ligado nos comprimentos de onda selecionados e A é a absorbância a qualquer ponto dado durante a titulação. A plotagem de r/C_f vs. r fornece a constante de ligação K_b como a curva do gráfico [16]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores de K_b foram postos em média.

Análise da interação de PND com DNA de Timo de Bezerro por meio de espectroscopia de dicroísmo circular

[0106] As medições dos espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidas em um espectropolarímetro JASCO-1100 equipado com uma lâmpada de xenônio (JASCO, Easton, MD). O DNA de CT e os tampões foram adquiridos da Sigma Aldrich. Uma solução estoque de DNA de CT foi preparada em tampão Tris/HCl buffer (5 mM de Tris/HCl, 50 mM de NaCl, pH = 7,39) e sua concentração (4,325 mM) foi determinada por espectrofotometria pela utilização de um coeficiente de excitação molar de 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm. Uma diluição de 150 µM em tampão Tris/HCl foi preparada e utilizada para os experimentos. Uma solução estoque de 2,0 mM de PND foi preparada recentemente em água MQ antes do uso. O volume apropriado desta solução foi adicionado a 3 ml de soluções de trabalho de 150 µM de DNA de CT para se obter proporções molares de 0,03, 0,06, 0,2 e 0,3 de PND/DNA. As amostras foram preparadas em triplicata e incubadas por 30 minutos e 20 horas. Todos os espectros de CD de DNA e DNA/PND foram registrados a 25°C por uma faixa de 205-380 nm e finalmente corrigidos com um branco e redução de ruído. Os dados finais são a média de três experimentos e são expressos em miligraus (mdeg).

Análise Estatística

[0107] Para cada ponto de dado, as médias de triplicatas e seus correspondentes desvios padrão são registradas. A significância estatística foi determinada por meio de dois testes t pareados de Student bicaudais, e um valor P de < 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

A PND exibe toxicidade potente e seletiva para linhagens de células cancerígenas

[0108] Os efeitos citotóxicos de PND foram analisados por meio de formação de imagem de célula viva pela utilização de ensaio de marcação nuclear diferencial (DNS), em onze linhagens de células cancerígenas humanas e linhagens de células não cancerígenas de controle (MCF-10A; Figura 5). Para cada linhagem celular individual, curvas de resposta dependente de dose foram criadas, utilizando-se também o ensaio DNS, para se determinar a CC₅₀ da PND

nestas linhagens celulares. Em geral, a PND apresentou uma citotoxicidade potente sobre células testadas com valores de CC_{50} consistentes a concentrações micromolares baixas que variavam de 1,6 μM a 9,4 μM (Figura 5). Tal como mostrado na Figura 6A-B, os efeitos em várias concentrações de PND sobre a linhagem de célula de câncer de mama tripla negativa MDA-MB-231 e a linhagem de células de leucemia promielocítica aguda HL-60 revelaram que a PND apresentava valores de CC_{50} de 1,6 μM e 1,9 μM , respectivamente (Figura 6A-B). Nestes e em outros ensaios, foram utilizadas células não tratadas para definir os níveis basais de células mortas por manipulação de células e cultura de células. Células tratadas com solvente foram também utilizadas como um controle para morte celular não específica e para propósitos de normalização e células tratadas com H_2O_2 foram utilizadas como controle positivo para citotoxicidade (Figura 6). A PND apresentou um índice de citotoxicidade seletiva significativa (SCI) em quatro de seis linhagens de células de câncer de mama testadas, MDA-MB-231, MDA-MB-231 LM2, MDA-MB-468 e MCF-7 com valores de SCI de 4,13, 2,54, 3,88 e 4,13, respectivamente, em comparação com as células de mama não cancerígenas MCF-10A (Figura 5). Interessante observar que os valores de SCI (<1) não foram favoráveis em T47D e HCC-70 com valores abaixo de 1 (Figura 5). Em adição, o valor de SCI mais alto em células de leucemia/linfoma testadas correspondeu à linhagem celular HL-60 com um valor de SCI de 3,5 (Figura 5). Adicionalmente, a PND apresentou um valor de SCI de 3 e 3,3, para células Ramos e Jurkat, respectivamente, mas baixa seletividade foi observada para a linhagem celular CEM (Figura 5). Uma boa seletividade foi detectada em linhagem celular de melanoma (SCI = 3,2) e em duas de três linhagens de câncer de ovário testadas (SCI = 3,9). No entanto uma baixa seletividade ($< 2,0$) foi detectada em linhagens de câncer de pâncreas e pulmão (Figura 5). Uma vez que a PND exibiu valores baixos de CC_{50} e mostrou seletividade significativa (SCI > 3) tanto na linhagem celular MDA-MB-231 quanto na HL-60, ambas foram selecionadas para análise posterior.

A PND provoca a externalização de fosfatidilserina tanto em células MDA-MB-231 quanto em células HL-60

[0109] De maneira a se discernir se PND induz sua citotoxicidade por meio de apoptose ou necrose, células foram tratadas com duas concentrações diferentes de PND por 24 h, 34 μM e 68 μM para HL-60 e 11 μM e 22 μM para MDA-MB-231. Subsequentemente, as células foram marcadas com anexina V-FITC e PI e analisadas por meio de citometria de fluxo. Foi encontrado que a PND induz externalização significativa de fosfatidilserina (PS) em ambas as linhagens celulares em comparação com os controles positivos e negativos ($P < 0,001$; (Figura 7A-B). A PND induziu externalização significativa de PS em células HL-60 de uma maneira dependente de dose, mostrando 14,8% e 30,2% de células apoptóticas a 34 μM e 68 μM , respectivamente ($P = 0,0033$, Figura 7A). Adicionalmente, a PND induziu uma percentagem mais alta de externalização de PS em células MDA-MB-231 que em células HL-60 em ambas as concentrações testadas com 67,2% e 71,1% de células positivas para anexina a 11 μM e 22 μM , respectivamente (Figura 7B). Como esperado, as células tratadas e não tratadas com solvente não exibiram qualquer incremento significativo em morte apoptótica ou necrótica (Figura 7A-B). Além disso, H_2O_2 induziu seu efeito citotóxico por meio de apoptose e necrose em células MDA-MB-231 e HL-60, respectivamente (Figura 7A-B). Desta forma, a PND induziu externalização de PS tanto nas células MDA-MB-231 quanto nas células HL-60, que é um evento precoce bem conhecido na ativação de apoptose.

A PND induz despolarização mitocondrial em células cancerígenas

[0110] Um evento bioquímico precoce que aciona a rota de apoptose intrínseca é a despolarização mitocondrial, a qual pode ser quantificada pela utilização de um reagente policromático JC-1 e citometria de fluxo. O JC-1 emite um sinal fluorescente vermelho ou verde quando as mitocôndrias estão polarizadas ou despolarizadas, respectivamente. Consequentemente, tanto células MDA-MB-231 quanto células HL-60 foram incubadas por 6 h com PND e o status do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) foi registrado. Como esperado,

com base nos dados de externalização de PS, ambas as células cancerígenas tratadas com PND revelaram despolarização mitocondrial significativa, em comparação com células não tratadas ou tratadas com solvente (Figura 7C-D). Estes resultados indicam que a PND é capaz de provocar despolarização mitocondrial em ambos os tipos de células cancerígenas indicando ainda que a PND induz morte celular por meio da rota de apoptose intrínseca. A PND rompe o perfil de ciclo celular e mostra fragmentação de DNA em células MDA-MB-231 e HL-60.

[0111] De maneira a examinar como as células MDA-MB-231 e HL-60 proliferam na presença de PND, O perfil de distribuição do ciclo celular foi examinado por meio de citometria de fluxo (Figura 8). De maneira a determinar os efeitos da PND sobre a progressão do ciclo celular, foi utilizada uma estratégia para quantificar o conteúdo de DNA celular que dependente do fluoróforo de intercalação de DNA excitado por luz violeta, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Após o tratamento de células MDA-MB-231 com PND, uma redução significativa da subpopulação de células G0/G1 foi observada; no entanto, este efeito não foi observado em células HL-60 (Figura 8B e F). A PND reduziu as subpopulações de S e G2/M tanto nas células MDA-MB-231 quanto nas células HL-60 em comparação com os controles de PBS e não tratados (Figura 8B-D e F-H). Adicionalmente, a PND provocou fragmentação significativa de DNA em uma maneira dependente de concentração em ambas as linhagens de células cancerígenas, como indicado por um aumento significativo na subpopulação sub-G0/G1 ($P < 0,0005$; Figura 8A e E). As diferenças nas percentagens de ambas as células em cada fase do ciclo celular entre células tratadas com PBS e não tratadas foram essencialmente não discerníveis. Estes experimentos revelaram que a PND rompeu a distribuição do perfil do ciclo celular e induziu a fragmentação de DNA (população sub-G0/G1) em ambos os tipos de células cancerígenas.

A PND interage diretamente com dsDNA

[0112] A interação potencial entre PND e dsDNA foi examinada com o uso de um ensaio de troca de mobilidade de DNA utilizando-se DNA plasmidial como um substrato de ligação, e comparada com a da quinacrina, um composto com estrutura comparável, e um intercalador de DNA bem conhecido. Quando 1 mM de PND foi incubado com DNA foi observada uma redução marcável na migração de DNA tratado com PND, em comparação com DNA plasmidial livre (as trocas são indicadas no lado esquerdo da Figura 9). Aproximadamente metade do DNA total de entrada foi localizada no poço de carga com mobilidade mínima no gel de agarose. Além disto, quando 0,5 e 0,25 mM de PND foram incubados com DNA, houve uma redução clara na mobilidade (observada no lado esquerdo da Figura 9). Adicionalmente, o tratamento com PND não resultou na degradação do DNA com base na ausência de fragmentos de DNA menores que o DNA livre superenrolado (Figura 9). Nos estudos anteriores, encontrou-se também que a quinacrina, com uma estrutura química similar à PND, interage com DNA por intercalação. Como mostrado na Figura 9, a quinacrina causou o retardo máximo da mobilidade do DNA na concentração mais alta testada (1 mM) como evidenciado por uma mancha, indicativa de complexos com DNA superenrolado. Também, a quinacrina provocou um retardo claro da mobilidade do DNA, similar à PND, quando testada a 0,5 e 0,25 mM (Figura 9). Como foi o caso com DNA tratado com PND, a quinacrina não exibiu qualquer atividade de degradação de DNA (Figura 9). O PI, que foi utilizado como um controle positivo para ligação de DNA, também provocou o retardo da mobilidade de DNA. Nossos resultados claramente indicam que a PND pode interagir diretamente com DNA provocando sua troca de mobilidade em géis de agarose e o comportamento similar ao da quinacrina pode sugerir que a PND apresenta também a capacidade de intercalar entre as bases do dsDNA.

A PND intercala com DNA como determinado pela titulação por espectrofotometria de UV-Visível

[0113] De maneira a provar adicionalmente a interação com intercalação de PND com DNA de CT, foram realizadas titulações espectrofotométricas em

tampão Tris/HCl. A PND mostra bandas de absorção fortes na região de 300-500 nm típica de transições entre os níveis de energia de elétron de anéis aromáticos conjugados. Em geral, os efeitos hipocrômicos e batocrômicos observados nos máximos de absorbância de UV-Visível podem ser tomados como evidência de interações de empilhamento entre sistemas aromáticos conjugados que intercalam as nucleobases de DNA. A Figura 10A mostra os espectros de absorção de PND na região estudada por adições consecutivas de DNA de CT. O máximo de absorbância a 424 nm foi estudado para o diagnóstico da interação composto-DNA. Nossos resultados mostram um efeito hipocrômico significativo (39%) e uma troca para vermelho de 8 nm. Em adição, a equação de Scatchard foi utilizada para determinar a afinidade de ligação [$8,5 \pm 0,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$] de PND para DNA de CT. Todos os dados de ligação de PND com DNA de CT, mostrados na Figura 10B, são comparáveis aos dos agentes de intercalação bem conhecidos com estrutura similar e indicam que a PND é também capaz de se intercalar entre as bases de DNA, como sugerido pelo ensaio de troca de mobilidade.

A PND estabiliza a conformação B do DNA de CT como observado pela espectroscopia de dicroísmo circular

[0114] Em adição, alterações conformacionais detalhadas do DNA foram estudadas por meio de espectroscopia de dicroísmo circular em tampão Tris/HCl. Um espectro de CD típico de DNA de CT em sua forma B mostra uma banda positiva com um máximo de 275 nm devido ao empilhamento de base e uma banda negativa com um mínimo de 248 nm devido à hélice para a direita. Desta forma, alterações nos sinais de CD podem ser associados a alterações correspondentes na estrutura secundária do DNA. A Figura 11, A e B, mostra o espectro de CD do DNA de CT, e o efeito do tratamento com quantidades crescentes de PND por 30 minutos e 20 horas, respectivamente. Nossos resultados mostram que a PND foi capaz de aumentar a intensidade tanto da banda negativa quanto da banda positiva em um amaneira dependente da concentração, mas sem trocas de vermelho significativas em qualquer uma delas.

Estes resultados são comparáveis aos compostos similares previamente reportados e sugere que a PND é capaz de estabilizar a forma B voltada para a direita do DNA sem alterações conformacionais significativas. O fato das mesmas alterações espectrais terem sido observadas para as incubações de 30 minutos e 20 horas sugere que o tipo de interação ocorre em uns poucos minutos, confirmando o modo intercalado da ligação. Em adição, um sinal positivo apareceu na faixa de 300-340 nm, uma região em que o DNA não absorve luz, sugerindo que alguma alteração assimétrica esteja possivelmente sendo induzida na PND pela ligação ao DNA de CT, uma vez que não é observado qualquer sinal para PND na ausência do ácido nucleico (ver Figura 10, C).

Discussão

[0115] em todas as linhagens de células cancerígenas analisada, foi encontrado que o tratamento com PND causa morte celular a concentrações micromolares baixas (de 1,6 μM a 9,4 μM). Aparte de ser menos tóxica para células não cancerígenas (MCF-10A; CC_{50} de 6,6 μM), a PND mostrou seletividade favorável em várias células de câncer de mama, em comparação com células não cancerígenas, com um valor de $\text{SCI} > 2.5$. A PND exibiu também valores favoráveis de SCI (de 1,43 a 3.47) em leucemia/células de linfoma mostrando a seletividade mais alta para células cancerígenas HL-60.

[0116] O modo de ação da PND foi analisada tanto em linhagens de células cancerígenas MDA-MB-231 quanto HL-60. Após exposição a um agente tóxico, as células podem ser submetidas a duas rotas principais, necrose ou apoptose. A fosfatidilserina (PS) é preferencialmente localizada no lado interno da do folheto da membrana plasmática, voltado para o citosol e quando as células iniciam a rota da apoptose, é translocada para ao folheto externo da membrana plasmática, que é uma marca bioquímica da apoptose. A citometria de fluxo identificou esta faceta apoptótica quando da utilização de iodeto de propídio e anexina V conjugada com FITC que apresenta alta afinidade para PS. As células MDA-MB-231 e HL-60 tratadas com PND exibiram

consistentemente externalização de PS, sugerindo que a PND utiliza a rota da apoptose para infligir sua citotoxicidade de maneira dependente de dose.

[0117] Além disto, a apoptose pode ser iniciada por meio de rotas bioquímicas intrínsecas ou extrínsecas. Um evento bioquímico crítico que aciona a ativação da rota intrínseca é por meio da despolarização mitocondrial. Desta forma, as células MDA-MB-231 e HL-60 foram expostas à PND e marcadas com o reagente policromático JC-1 para investigar se a despolarização mitocondrial estava envolvida em seu mecanismo para induzir morte celular. Nossos dados indicam claramente que ambas as linhagens de células cancerígenas exibiram uma despolarização mitocondrial significativa após exposição a PND, indicando que a rota intrínseca de apoptose está envolvida em seu mecanismo citotóxico.

[0118] Uma estratégia bem sucedida para o estudo do perfil de ciclo celular profile se baseia na quantificação do teor de DNA celular por meio de citometria de fluxo. Quando da utilização desta abordagem, é possível se distinguir três fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M. em adição, independentemente de qual sinal de iniciação é utilizado para ativar a cascata apoptótica, o sinal de morte em última análise resulta na fragmentação do DNA; uma marca bioquímica tardia da apoptose. Quando da realização da análise do ciclo celular por meio de citometria de fluxo, as células passando por fragmentação de DNA são fáceis de identificar pela presença de uma subpopulação sub-G0/G1, um pico distinto localizado no lado esquerdo dos histogramas de ciclo celular. Desta forma, a ocorrência de fragmentação de DNA induzida por apoptose, bem como o ciclo celular, foi analisada concomitantemente após a incubação das células com PND por 72 h. Estes ensaios revelaram que a PND foi capaz de perturbar a progressão do perfil de ciclo celular nas células MDA-MB-231 e HL-60, detectando um padrão dissimilar de cada linhagem celular. Em adição, a PND causou fragmentação consistente de DNA tanto nas células MDA-MB-231 quanto nas células HL-60 em uma maneira dependente de dose, confirmando os resultados anteriores de que a PND induz apoptose.

[0119] A interação entre DNA e fármacos ou proteínas pode ser facilmente detectada pelo retardo da migração do DNA durante o ensaio de troca de mobilidade por meio de eletroforese em gel. Nestes ensaios de ligação de DNA, os complexos composto-DNA experimentais migram mais lentamente que o DNA livre (DNA não complexado de controle), o que resulta do fato do DNA apresentar um peso molecular mais alto. Adicionalmente, quando da incubação de um composto químico com DNA plasmidial, é possível se detectar se há quaisquer efeitos deletérios resultando na degradação ou fragmentação do DNA. Os resultados indicam que a PND interage diretamente com DNA uma vez que provoca retardo significativo do DNA em géis de agarose, em uma maneira dependente de concentração, mas não provoca degradação do DNA. O modo intercalado da ligação de DNA de PND foi confirmado por titulação de espectrofotométricas de UV-Visível, bem como dicroísmo circular de DNA de CT. Em adição, os espectros de CD proveram evidência de estabilização do DNA de CT em sua forma B sem alterações conformacionais detectáveis pela interação com PND. Coletivamente, o ensaio de troca de mobilidade, séries UV-Visível e CD de experimentos, fornecem evidência convincente de que a PDN liga DNA por intercalação com as nucleobases do DNA.

[0120] Neste estudo pré-clínico, as descobertas indicam que a PND mostra citotoxicidade potente, com baixos valores micromolares de CC_{50} e índice de citotoxicidade seletiva favorável, em relação a um painel de células cancerígenas humanas, mostrando seletividade significativa contra células cancerígenas de mama triplo negativas MDA-MB-231 (uma classe de tumores agressivos) e células HL-60 de leucemia. A PND e compostos e derivados relacionados apresentam atividade como fármacos anticâncer, uma vez que a PND mostra marcadamente e consistentemente seu efeito citotóxico pela ativação da rota da apoptose, como evidenciado pela externalização de PS, despolarização mitocondrial, fragmentação de DNA e interferência com o ciclo celular. Além disto, foi encontrado que a PND interage diretamente com DNA provocando um retardo do DNA durante a eletroforese em gel de agarose, e alterações espectrais

no perfil de UV-Visível da PND, bem como dos espectros de CD do DNA, sugerindo um modo intercalado de ligação.

Exemplo 4 – Análise da atividade de PND em câncer de mama metastático em camundongos

Material e Métodos

[0121] 12 camundongos comparáveis com células cancerígenas de mama metastáticas da linhagem celular MDA-MB-231 LM2-LUC4 foram injetados ou com uma solução aquosa de pironaridina (PND) ou com placebo (água), todos os dias utilizando-se uma técnica de alimentação por força de gavagem. O tratamento foi iniciado quando os tumores alcançaram 150 - 300 mm³ de tamanho (isto é, Dia 1).

[0122] No grupo tratado com PND (n = 6), todos os 6 camundongos receberam 160 mg/kg a partir do Dia 1 ao Dia 9. Os camundongos tratados com PND números 2, 4, e 5 receberam 160 mg/kg durante todo o estudo, enquanto os camundongos tratados com PND números 1, 3 e 6 apresentaram os tumores maiores no grupo no Dia 9 e tiveram suas doses aumentadas nos Dia 10 para 240 mg/kg e novamente no Dia 13 para 320 mg/kg. Os camundongos de controle (n = 6) receberam placebo durante todo o estudo. O tamanho de cada tumor foi medido diariamente. O ponto final do protocolo foi quando um tumor alcançou 1500 mm³ de tamanho, acionando a eutanásia do camundongo. Para a análise, o nível de significância foi estabelecido em $P < 0.05$.

Resultados

[0123] Uma comparação dos tamanhos dos tumores a partir do Dia 1 para o 9 mostrou que em média os tumores cresceram maiores nos camundongos de controle (750 mm³) que nos camundongos tratados com PND (430 mm³). A diferença foi significativa, valor P do teste f de 0,01 (ver Figura 12A). Uma comparação dos tamanhos dos tumores a partir do Dia 1 para o 15 (quando todos os 12 camundongos estavam vivos) mostrou quem, em média, os tumores cresceram maiores no grupo de placebo que no grupo tratado com PND, e a diferença foi significativa, valor P do teste f de 0,0001 (ver Figura 12B).

[0124] Houve uma diferença significativa na duração da sobrevivência favorecendo o grupo tratado com PND, embora, após o Dia 15, as comparações tenham se tornado complicadas devido ao aumento das doses nos 3 camundongos tratados com PND e devido à eutanásia dos camundongos de placebo.

[0125] Durante o estudo, não houve relato de eventos adversos negativos exceto desconformo no andar após o Dia 15. Todos os 6 camundongos tratados com PND aproximadamente no Dia 20 mostraram um amarelamento nos olhos, pele, ouvidos e patas provavelmente devido ao fato da PND ser um pigmento amarelo forte. Não foram observadas perda de peso, distúrbios alimentares ou problemas de higiene. Os 6 camundongos tratados com PND foram dissecados e não foram observados quaisquer sinais de acúmulo de PND em qualquer parte incluindo no estômago, intestinos ou fígado.

[0126] Os resultados claramente demonstraram que nos camundongos tratados com PND, os tumores de câncer de mama metastático cresceram menos que nos camundongos que receberam placebo.

Exemplo 5 – Análise da atividade de PND em conjunto com quimioterapia

Material e Métodos

[0127] A PND foi adicionada às culturas da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 24 horas após as células serem tratadas com uma seleção fármacos quimioterapêuticos comerciais conhecidos, antes das células serem analisadas para morte celular. Cada um dos fármacos era conhecidos por apresentar efeitos colaterais sérios nas doses comumente administradas para o tratamento de câncer. A dose dos fármacos quimioterapêuticos foi reduzida para a metade, um quarto, um oitavo e um décimo sexto da dose inicial; enquanto a dose de PND foi mantida a mesma. O efeito destas terapias de combinação foi medido pela concentração de cada composto necessária para ser citotóxica para pelo menos 50 por cento das células cancerígenas (CC_{50}). Para cisplatina, gemcitabina, bortezomib e MG132, a dose inicial (CC_{50}) foi de 95,42 μ M, 0,44

μM , 0,01 μM e 0,5 μM , respectivamente, enquanto a dose de PND foi mantida constante a 5,5 μM .

Resultados

[0128] Os resultados mostrados na Figura 12 demonstram que a coadministração de PND (onde a PND é administrada após o fármaco quimioterapêutico) pode reduzir grandemente a quantidade de fármaco requerida para matar efetivamente as células cancerígenas.

Exemplo 6 – Tratamento de câncer em estado tardio em caninos com PND

Materiais e Métodos

[0129] Um estudo de rótulo aberto foi conduzido para se avaliar a eficácia na longevidade crescente e para avaliar a segurança do tetrafosfato de pironaridina (PND) oral em cinco pacientes caninos com câncer terminal.

[0130] Os pacientes elegíveis apresentavam uma malignidade que era metastática ou não removível por cirurgia e para a qual medidas curativas ou paliativas padrão não existiam ou não eram mais efetivas. Devido a questões éticas de tratamento de cães com doença terminal, não houve grupo de placebo.

[0131] A PND foi obtida da Mangalam Drugs and Organics, Ltd., e foi encapsulada em cápsulas de gelatina para administração oral duas vezes ao dia.

[0132] O resultado primário avaliado foi a diferença entre a duração da sobrevivência esperada do paciente no momento do estudo e sua sobrevivência real. Os resultados secundários foram: atividade antitumoral, alívio do sintoma associado à malignidade e a segurança e tolerabilidade da PND.

[0133] O estudo nos cinco cães foi como se segue:

[0134] Caso 1, Carcinoma de mastócitos: Cão (Golden Retriever), fêmea, 6 anos de idade, 28,7 kg. O câncer foi confirmado por relatório de histopatologia. Em meados de maio de 2019 foi iniciada a administração de PND oral ao cão após o que o paciente não recebeu qualquer outra medicação contra câncer. O veterinário esperava uma duração de sobrevivência de entre 4 e 6 meses no momento da entrada no estudo. O paciente recebeu 23 mg/kg/dia de PND (325 mg pela manhã e 325 mg à noite).

[0135] Caso 2, Osteosarcoma: Cão (Saint Bernard), macho, 5 anos de idade, 49,7 kg. Em 17 de maio de 2019 foi iniciada a administração de PND oral após o que o paciente não recebeu qualquer outra medicação contra câncer. O veterinário esperava uma duração de sobrevivência de entre 4 e 6 meses no momento da entrada no estudo. O paciente recebeu 20 mg/kg/dia de PND (325 mg pela manhã e 650 mg à noite).

[0136] Caso 3, sarcoma de célula falciforme: Cão (Border Collie), macho, 9 anos de idade, 28,5 kg. Em 2014 o cão foi diagnosticado com um sarcoma de célula falciforme de baixo grau e sendo necessária eutanásia em 11 de fevereiro de 2019, com uma expectativa de vida de 1-2 semanas. Em vez disto, o veterinário iniciou a administração de PND oral em 11 de fevereiro de 2019 após o que o paciente não recebeu qualquer outra medicação contra câncer. O paciente recebeu 15 mg/kg/dia de PND (215 mg pela manhã e 215 mg à noite).

[0137] Caso 4, linfoma não de Hodgkin: Cão (Boxer), fêmea, 27 kg, 11 anos de idade. O câncer foi confirmado por relatório de biópsia. Em dezembro de 2018 foi iniciada a administração de PND oral ao cão após o que o paciente não recebeu qualquer outra medicação contra câncer. O paciente recebeu 15 mg/kg/dia de PND (210 mg pela manhã e 210 mg à noite). No entanto, a administração de PND foi interrompida em fevereiro de 2019 (devido a problemas de envio do EUA para o Canadá) e nunca retomada.

[0138] Caso 5, tumor de mastócito: Cão, macho, 27,9 kg. O câncer foi confirmado por relatório de histopatologia. Um tumor foi retirado cirurgicamente da língua e não havia borda limpa. Em dezembro de 2018 foi iniciada a administração de PND oral após o que o paciente não recebeu qualquer outra medicação contra câncer. O paciente recebeu 15 mg/kg/dia de PND (210 mg pela manhã e 210 mg à noite).

Resultados

[0139] Caso 1: Não houve quaisquer relatos no fármaco de estudo relativos a eventos adversos. Os volumes de quatro tumores foram medidos no momento da entrada no estudo e comparados com medições de acompanhamento. Nódulo

mandibular direito de 2,5 cm X 2 cm *versus* 2 cm X 1 cm; Nódulo mandibular esquerdo de 3 cm X 2 cm *versus* 2,2 cm X 1 cm; Nódulo poplíteo direito (traseira do joelho) de 0,5 cm X 0,5 cm *versus* 0,2 cm X 0,2 cm; e Nódulo poplíteo esquerdo: 0,5 cm X 0,5 cm *versus* 0,2 cm X 0,2 cm. O cão ainda estava vivo e o alívio do sintoma associado à malignidade permitiu atividades diárias a partir de junho de 2019. Em todos os casos nas medições de acompanhamento o volume do tumor foi reduzido em tamanho em uma quantidade clínica significativa.

[0140] Caso 2: Os únicos relatórios de eventos adversos possivelmente relacionados ao fármaco de estudo foram babar, inchaço facial e vômito que foram resolvidos com difenidramina. O tamanho do tumor no momento da entrada no estudo era de 3,7 cm X 2,6 cm. Em junho de 2019, o cão ainda estava vivo e em boas condições na medida em que o alívio do sintoma associado à malignidade permitiu atividades diárias.

[0141] Caso 3: Não houve qualquer relatório de eventos adversos associados ao fármaco de estudo exceto vômito inicial, o qual foi controlado. Os volumes de três tumores foram medidos no momento da entrada no estudo: 2 cm X 2,5 cm; 3 cm X 3,8 cm; e 3 cm X 4 cm. No acompanhamento o volume de cada tumor foi relatado como tendo reduzido em aproximadamente 20%. Em meados de maio de 2019 o cão foi sacrificado, a sobrevivência do cão foi alongada em 3 meses.

[0142] Caso 4: Não houve quaisquer relatórios de qualquer evento adverso relacionado ao fármaco de estudo. O volume de um tumor no pescoço do paciente foi medido no momento da entrada no estudo e comparado com medições de acompanhamento. O tumor encolheu em 70% em março de 2019. Em 20 de abril de 2019 o cão foi sacrificado, a sobrevivência do cão foi alongada em 2,5 meses.

[0143] Caso 5: O paciente apresentou aumento da mandíbula esquerda. O volume de um tumor foi medido no momento da entrada no estudo e comparado com medições de acompanhamento. O tumor permaneceu com o mesmo volume: 2 cm X 1 cm *versus* 2 cm X 1 cm. O cão ainda estava vivo e o alívio do

sintoma associado à malignidade permitiu atividades diárias a partir de junho de 2019.

Exemplo 7 – Tratamento de câncer em estágio tardio em humanos com PND

Materiais e Métodos

[0144] Um estudo de rótulo aberto com escalonamento de dose foi conduzido para se avaliar a longevidade e segurança do tetrafosfato de pironaridina (PND) oral em cinco pacientes humanos terminalmente doentes com cânceres selecionados. Os pacientes elegíveis apresentavam uma malignidade que era metastática ou não removível por cirurgia e para a qual medidas curativas ou paliativas padrão não existiam ou não eram mais efetivas. Os critérios de exclusão incluíram infecção ativa clinicamente significativa, doenças intercorrentes descontroladas, neutropenia e gravidez.

[0145] A PND foi obtida da Mangalam Drugs and Organics, Ltd, e a PND potencializada foi encapsulada em cápsulas de gelatina de tamanho “00” para administração oral. Cada cápsula continha ou 125 mg de PND e te celulose microcristalina como carga inerte (MCC) ou 200 mg de PND (sem carga).

[0146] Antes da entrada no estudo e antes de cada aumento de dose, se verificou se os resultados de laboratório da contagem sanguínea completa (CBC) e do painel metabólico completo (CMP) do paciente estavam dentro das faixas de referência normais.

[0147] Os pacientes foram instruídos a aumentar sua dose se não houvesse qualquer toxicidade inaceitável. O Grupo de Estudo 1 iniciou com uma dose diária de 250 mg por 2 semanas, então 375 mg por 2 semanas, então 500 mg em diante. O Grupo de Estudo 2 iniciou com uma dose diária de 200 mg por 2 semanas, então 400 mg por 2 semanas, em 600 mg em diante. Devido a questões éticas do tratamento de pacientes terminalmente doentes, não houve grupo de placebo.

[0148] Os resultados primários avaliados fora quanto a diferença entre a duração de sobrevivência esperada do paciente estimada no momento da entrada no

estudo (estimada em 2-4 semanas para cada paciente) e sua duração de sobrevivência real. Os resultados secundários foram alívio do sintoma associado à malignidade, atividade antitumoral, segurança e tolerabilidade da PND.

[0149] O estudo nos cinco humanos foi como se segue:

[0150] Caso 1, Homem, idade 65, via biliar hepática de Klatskin (ou colangiocarcinoma hilar) diagnosticado em março de 2018. Em 20 de dezembro de 2018, o paciente começou a tomar PND como protocolo, 2 cápsula/dia.

[0151] Caso 2, Homem, idade 43, câncer de pulmão, estágio IV, diagnosticado em maio de 2017. O paciente recebeu quimioterapia com o último ciclo em dezembro de 2018 e em 22 de janeiro de 2019, começou a tomar PND, 2 cápsula/dia.

[0152] Caso 3, Mulher, idade 55, câncer de ovário, estágio IV, diagnosticada em junho de 2017. A paciente recebeu quimioterapia com o último ciclo em novembro de 2018 e em 15 de janeiro de 2019, começou a tomar PND, 2 cápsula/dia.

[0153] Caso 4, Mulher, idade 54, câncer de mama, estágio IV, diagnosticada em setembro de 2017. Em 20 de janeiro de 2019, a paciente começou a tomar PND, 2 cápsula/dia.

[0154] Caso 5, Mulher, idade 40, câncer de pulmão de célula pequena, estágio IV, diagnosticada em abril de 2017. A paciente recebeu quimioterapia com o último ciclo em dezembro de 2018 e em 29 de janeiro de 2019, começou a tomar PND, 2 cápsula/dia.

Resultados

[0155] Caso 1: Não houve quaisquer relatos de quaisquer eventos adversos relacionados com o fármaco em estudo. Em junho de 2019, o paciente estava ainda vivo, seus resultados de CBC e CMP mais recentes estavam dentro das faixas de referência normais e seu alívio do sintoma associado à malignidade permitiu as atividades diárias.

[0156] Caso 2: Não houve quaisquer relatórios de eventos adversos relacionados ao fármaco em estudo. O paciente faleceu em 22 de fevereiro de 2019 de câncer de pulmão.

[0157] Caso 3: Não houve quaisquer relatórios de eventos adversos relacionados ao fármaco em estudo. A paciente faleceu em 29 de janeiro de 2019 de câncer de ovário.

[0158] Caso 4: A Paciente faleceu em 15 de fevereiro de 2019 de câncer de mama.

[0159] Caso 5: O único relato de um evento adverso relacionado ao fármaco em estudo foi irritação da pele durante a primeira semana de tratamento que desapareceu em uma semana, possivelmente relacionada ao fármaco em estudo. Em 2019, a paciente estava ainda viva, seus resultados mais recentes de CBC e CMP estavam dentro das faixas de referência normais, e seu alívio do sintoma associado à malignidade permitiu as atividades diárias.

[0160] A PND se mostra bem tolerada (a dose máxima tolerada não foi alcançada para qualquer paciente) e, ao ter estendido as vidas de 2 em 5 pacientes com câncer, há justificativa para estudos adequados e bem controlados que levam a um fármaco anticâncer a base de PND aprovado que aumenta as taxas de sobrevivência sem efeitos colaterais graves.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para induzir apoptose em células cancerígenas em proliferação para o tratamento ou prevenção de câncer em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

2. Método para induzir apoptose em células cancerígenas em proliferação em um tumor em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

3. Método para induzir morte celular em células cancerígenas em um tumor em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

4. Método para induzir morte celular em células cancerígenas para o tratamento ou prevenção de câncer em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta.

5. Método para reduzir o tamanho de um tumor em um mamífero, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de administração ao dito mamífero uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pironaridina (PND), ou um derivado ou sal farmacologicamente aceitável desta, onde a administração reduz o tamanho do tumor pela indução de apoptose em células cancerígenas em proliferação no tumor.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato do câncer ou tumor ser um carcinoma selecionado do grupo consistindo

em carcinoma de pâncreas, bexiga, mama, cólon, mesotelioma, rins, fígado, pulmão, incluindo câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não pequena, de cabeça e pescoço, esôfago, vesícula biliar, ovário, estômago, cervical, tireoide, próstata ou de pele, ou um sarcoma selecionado do grupo consistindo em fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, condrosarcoma, leiomiosarcoma, sarcoma mesotelial, angiosarcoma, liposarcoma, ou um tumor do sistema nervoso central e periférico selecionado do grupo consistindo em astrocitoma, neuroblastoma, glioma e schwannomas, ou outros tumores selecionados do grupo consistindo em melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, ceratocantoma, câncer folicular da tireoide e sarcoma de Kaposi, ou um câncer líquido (câncer de sangue) selecionado do grupo consistindo em linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkins, linfoma não de Hodgkins, linfoma de célula pilosa, linfoma de célula do manto, mieloma, linfoma de Burkett ou um linfoma extranodal do estômago, mama ou cérebro, mieloma, e linfomas extranodais do estômago, mieloma de célula do plasma, doença de Kahler, mieloma múltiplo, leucemia mielogenosa, leucemia granulocítica, leucemia linfática, leucemia linfocítica e leucemia linfoblástica.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato do câncer ser câncer de mama.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato do câncer ser um linfoma.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato da composição compreender adicionalmente, ou é coadministrada com, uma quantidade terapeuticamente efetiva de um fármaco quimioterapêutico selecionado do grupo consistindo em acetato de abiraterona, Paclitaxel ligado a Albumina (nab), Alemtuzumab, Altretamine, Asparaginase, Bendamustine, Bevacizumab, bleomicina, Bortezomib, Brentuximab vedotin, Busulfan, Cabazitaxel, Capecitabina, Carboplatina, Carmustina, Cetuximab, Clorambucil, Cisplatina, Cladribina, Crizotinib, Ciclofosfamida, Citarabina

(Ara-C), Dacarbazina, Dactinomicina, Dasatinib, Daunorubicin, DaunoXome (daunorubicina lipossômica), DepoCyt (citarabina lipossômica), Docetaxel, Doxil (doxorubicina lipossômica), Doxorubicina, mesilato de Eribulin, Erlotinib, Estramustina, Etoposídeo, Everolimo, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracil, Gefitinib, Gemcitabina, wafers de gliadel, Hidroxiureia, Ibritumomab, Ibritumomab, Idarubicina, Ifosfamida, Imatinib, Ipilimumab, Irinotecan, Ixabepilona, Lapatinib, Lenalidomida, Lomustina, Mecloretamina, Melfalano, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mioxantrona, MG132, Nilotinib, Oxaliplatina, Paclitaxel, Panitumumab, Pazopanib, Peginterferon alfa-2b, Pemetrexed, Pentostatina, Pralatrexato, Procarbazina, Rituximab, Romidepsina, Ruxolitinib, Sipuleucel-T, Sorafenib, Estreptozocina, Sunitinib, Temozolomida, Temsirolimo, Teniposídeo, Talidomida, Tioguanina, Tiotepa, Topotecan, Tositumomab, Trastuzumab, Valrubicina, Vandetanib, Vemurafenib, Vinblastina, Vincristina e Vinorelbina, ou uma combinação destes.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato do fármaco quimioterapêutico ser selecionado do grupo consistindo em bortezomib, cisplatina, gemcitabina e MG132.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato do fármaco quimioterapêutico ser Cisplatina.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato do fármaco quimioterapêutico ser Gemcitabina.

13. Método para o tratamento ou prevenção de câncer, **caracterizado** pelo fato de compreender a etapa de administração a um indivíduo necessitando de tal tratamento uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de um ligante de DNA e um ligante de proteína.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato do ligante de DNA ser um inibidor ou veneno de topoisomerase I e/ou II.

15. Método de acordo com a reivindicação 13 ou reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato do ligante de proteína inibir uma proteína quinase selecionada do grupo consistindo em MEK, Raf, ERK, PI3K, Akt, PDK1, GSK-

3, Wee1, Myt1, CHK1, CHK2, ATR, ATM, mTOR, CDK2, PIP5K, RIPK3, RIPK1, TAK1, FADD e PCK, e/ou isoformas destas.

16. Método de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato do ligante de DNA ser um 1,5-diaza-antraceno.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, **caracterizado** pelo fato do ligante de proteína compreender uma ou mais moléculas de pirrolidina.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 17, **caracterizado** pelo fato do ligante de DNA e do ligante de proteína serem componentes de um único composto.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato do composto ser pironaridina.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 19, **caracterizado** pelo fato do câncer ou tumor ser um carcinoma selecionado do grupo consistindo em carcinoma de pâncreas, bexiga, mama, cólon, mesotelioma, rins, fígado, pulmão, incluindo câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não pequena, de cabeça e pescoço, esôfago, vesícula biliar, ovário, estômago, cervical, tireoide, próstata ou de pele, ou um sarcoma selecionado do grupo consistindo em fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, condrosarcoma, leiomiosarcoma, sarcoma mesotelial, angiosarcoma, liposarcoma, ou um tumor do sistema nervoso central e periférico selecionado do grupo consistindo em astrocitoma, neuroblastoma, glioma e schwannomas, ou outros tumores selecionados do grupo consistindo em melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, ceratocantoma, câncer folicular da tireoide e sarcoma de Kaposi, ou um câncer líquido (câncer de sangue) selecionado do grupo consistindo em linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkins, linfoma não de Hodgkins, linfoma de célula pilosa, linfoma de célula do manto, mieloma, linfoma de Burkett ou um linfoma extranodal do estômago, mama ou cérebro, mieloma, e linfomas extranodais do estômago, mieloma de célula do plasma, doença de Kahler, mieloma múltiplo,

leucemia mielogenosa, leucemia granulocítica, leucemia linfática, leucemia linfocítica e leucemia linfoblástica.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato do câncer ser câncer de mama.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato do câncer ser um linfoma.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato da composição compreender adicionalmente, ou ser coadministrada com, uma quantidade terapêuticamente efetiva de um fármaco quimioterapêutico selecionado do grupo consistindo em acetato de abiraterona, Paclitaxel ligado a Albumina (nab), Alemtuzumab, Altretamina, Asparaginase, Bendamustina, Bevacizumab, bleomicina, Bortezomib, Brentuximab vedotin, Busulfano, Cabazitaxel, Capecitabina, Carboplatina, Carmustina, Cetuximab, Clorambucil, Cisplatina, Cladribina, Crizotinib, Ciclofosfamida, Citarabina (Ara-C), Dacarbazina, Dactinomicina, Dasatinib, Daunorubicina, DaunoXome (daunorubicina lipissômica), DepoCyt (citarabina lipissômica), Docetaxel, Doxil (doxorubicina lipissômica), Doxorubicina, mesilato de Eribulina, Erlotinib, Estramustina, Etoposídeo, Everolimo, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracil, Gefitinib, Gemcitabina, wafers de gliadel, Hidroxiureia, Ibritumomab, Ibritumomab, Idarubicina, Ifosfamida, Imatinib, Ipilimumab, Irinotecano, Ixabepilona, Lapatinib, Lenalidomida, Lomustina, Mecloretamina, Melfalano, Mercaptopurina, Metotrexate, Mitomicina, Mioxantrona, MG132, Nilotinib, Oxaliplatina, Paclitaxel, Panitumumab, Pazopanib, Peginterferon alfa-2b, Pemetrexed, Pentostatina, Pralatrexato, Procarbazina, Rituximab, Romidepsina, Ruxolitinib, Sipuleucel-T, Sorafenib, Estreptozocina, Sunitinib, Temozolomida, Temsirolimo, Teniposídeo, Talidomida, Tioguanina, Tiotepa, Topotecano, Tositumomab, Trastuzumab, Valrubicina, Vandetanib, Vemurafenib, Vinblastina, Vincristina e Vinorelbine, ou uma combinação destes.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato do fármaco quimioterapêutico ser selecionado do grupo consistindo em bortezomib, cisplatina, gemcitabina e MG132.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato do fármaco quimioterapêutico ser Cisplatina.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato do fármaco quimioterapêutico ser Gemcitabina.

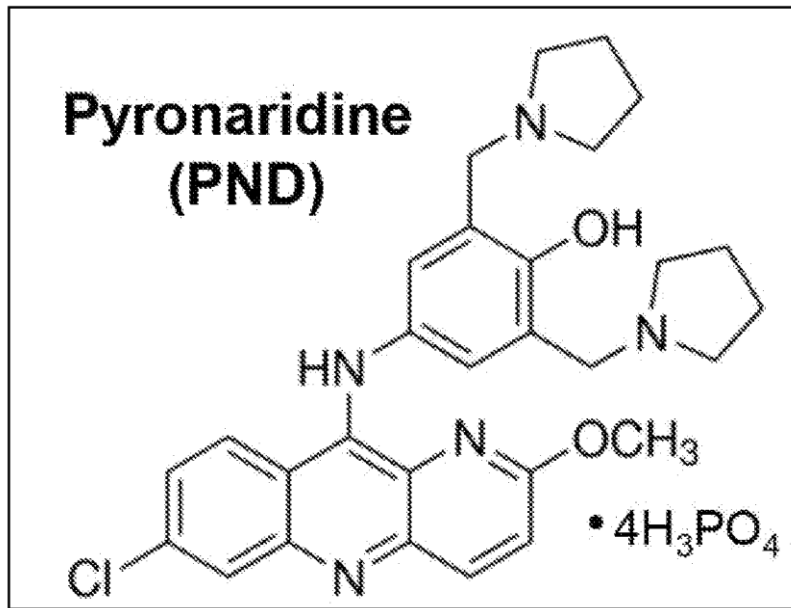


Figura 1

	median_score	name	description
PC3	97.44	SB-216763	glycogen synthase kinase inhibitor
VCAP	91.83	enzastaurin	PKC inhibitor, AKT inhibitor, angiogenesis inhibitor, apoptosis stimulant, PI3K inhibitor
A375	90.03	isiquiritigenin	guanylate cyclase activator, aldose reductase inhibitor, glutamate receptor antagonist,
A549	87.10	biindolylmaleimide	CDK inhibitor, PKC inhibitor, leucine rich repeat kinase inhibitor
H1E	86.85	PKCbeta-inhibitor	PKC inhibitor
HCC516	85.44	GSK-3-inhibitor IX	glycogen synthase kinase inhibitor, lipoxigenase inhibitor, PKC inhibitor
HT29	83.37	sappanone-a	melanogenesis inhibitor, tyrosinase inhibitor
MCF7	81.89	SA-53133	casein kinase inhibitor, tubulin inhibitor
HEPG2			
summary			

Figura 2

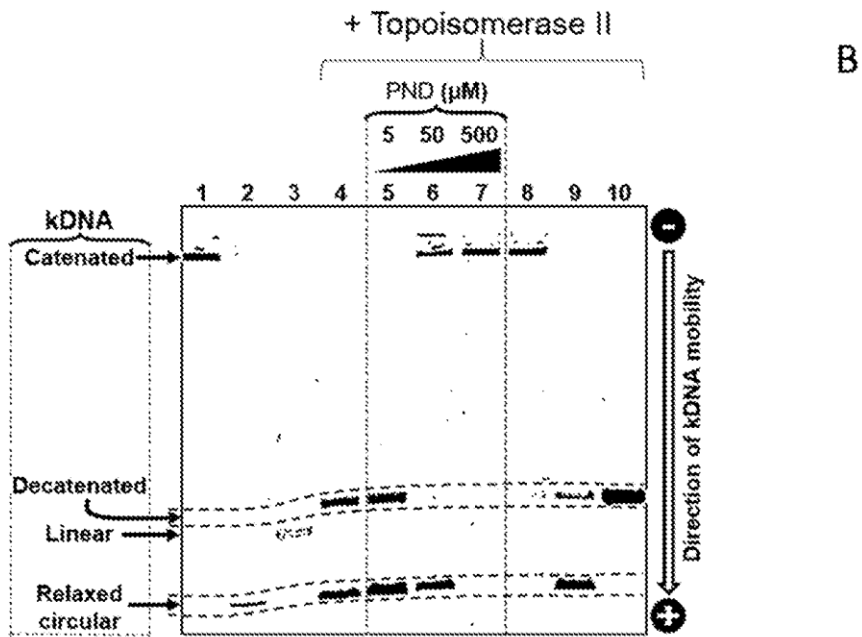
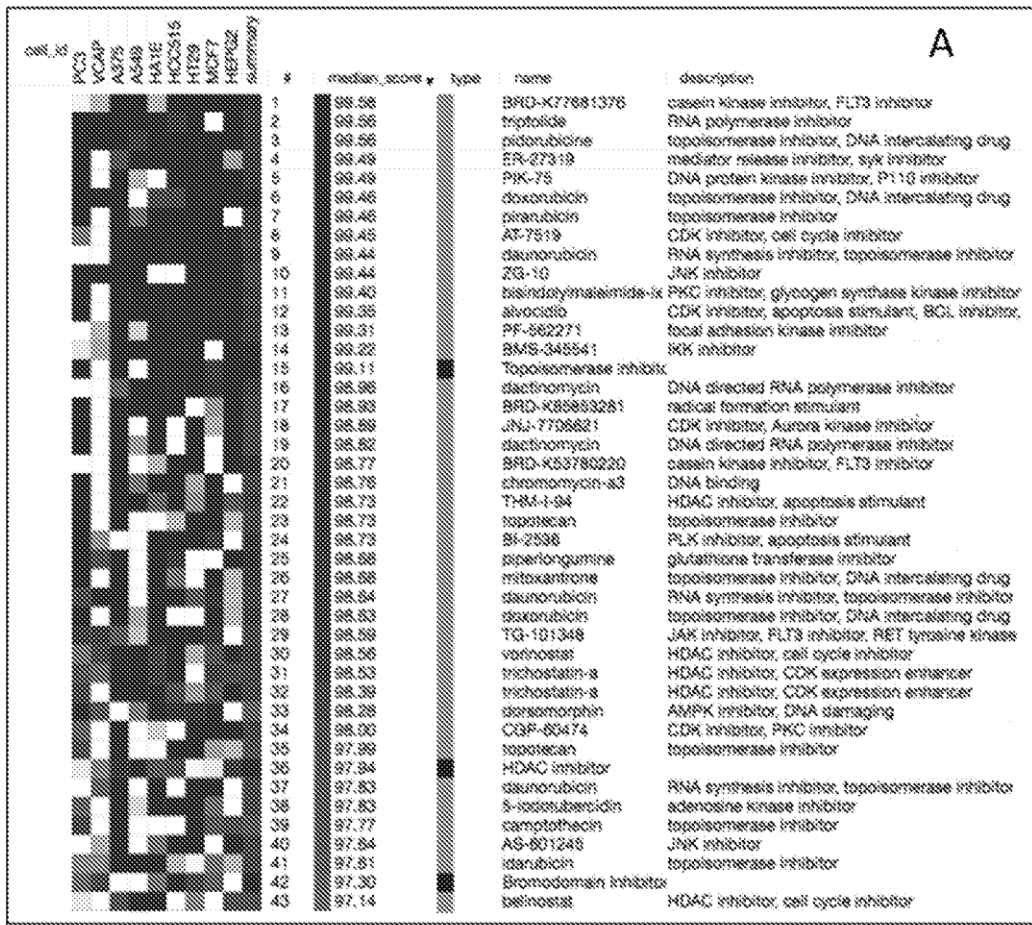


Figura 3

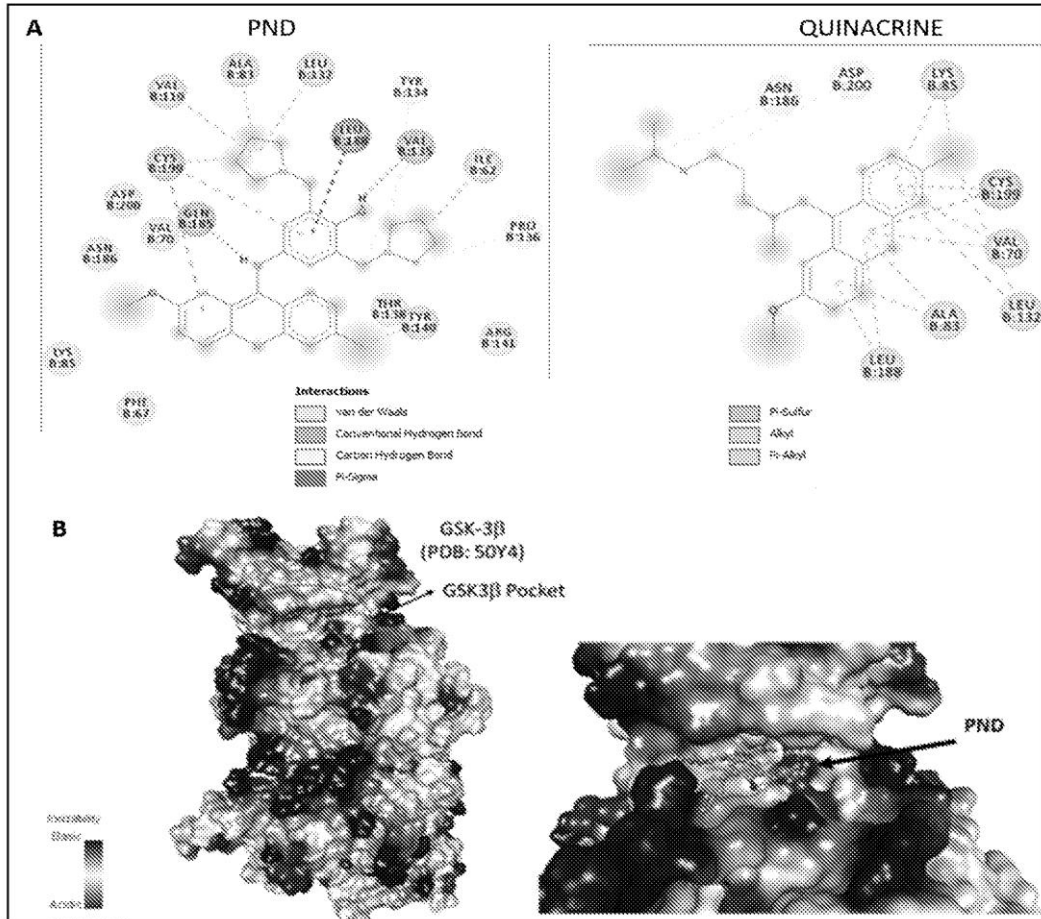


Figura 4

Cell Type	Cell Line Name	CC ₅₀ μ M	SCI
Breast Cancer	MDA-MB-231	1.6 \pm 0.20†	4.1
Breast Cancer	MDA-MB-231 LM2‡	2.6 \pm 0.18	2.5
Breast Cancer	MDA-MB-468	1.7 \pm 0.60	3.9
Breast Cancer	T47D	9.4 \pm 1.41	0.7
Breast Cancer	HCC1419	7.0 \pm 0.33	0.9
Breast Cancer	MCF-7	1.6 \pm 0.40	4.1
Breast Cancer	HCC-70	1.5 \pm 0.51	4.4
Breast Epithelial	MCF-10A	6.6 \pm 0.42	1.0
Normal Fibroblast	HS-27	3.1 \pm 0.39	2.1
Leukemia	HL-60	1.9 \pm 0.07	3.5
Burkitt's Lymphoma	Ramos	2.2 \pm 0.16	3.0
T-cell Lymphoma	Jurkat	2.0 \pm 0.11	3.3
T-cell Lymphoma	CEM	4.6 \pm 0.09	1.4
Melanoma	A375	2.0 \pm 0.03	3.2
Ovarian Cancer	Ovcar 8	1.7 \pm 0.22	3.9
Ovarian Cancer	Ovcar 5	1.7 \pm 0.06	3.9
Ovarian Cancer	Ovcar 3	3.3 \pm 0.02	2.0
Lung Cancer	A549	3.5 \pm 0.21	1.9
Pancreatic Cancer	Panc-1	6.5 \pm 0.07	1.0

† Mean \pm Standard Deviation

‡ Lung Metastatic (LM) variant of MDA-MB-231

Figura 5

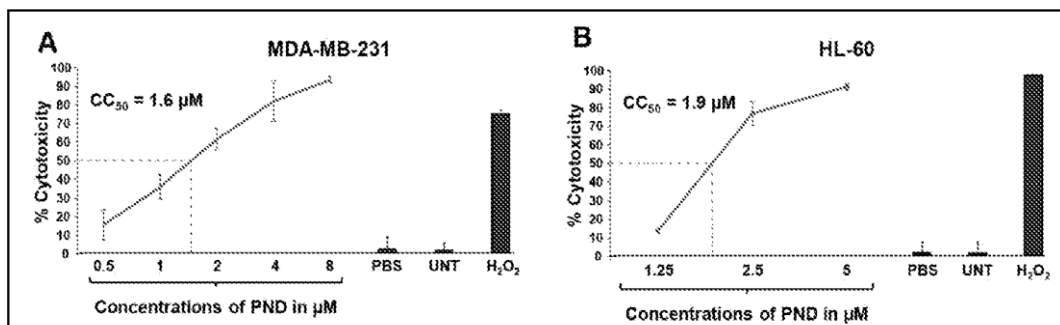


Figura 6

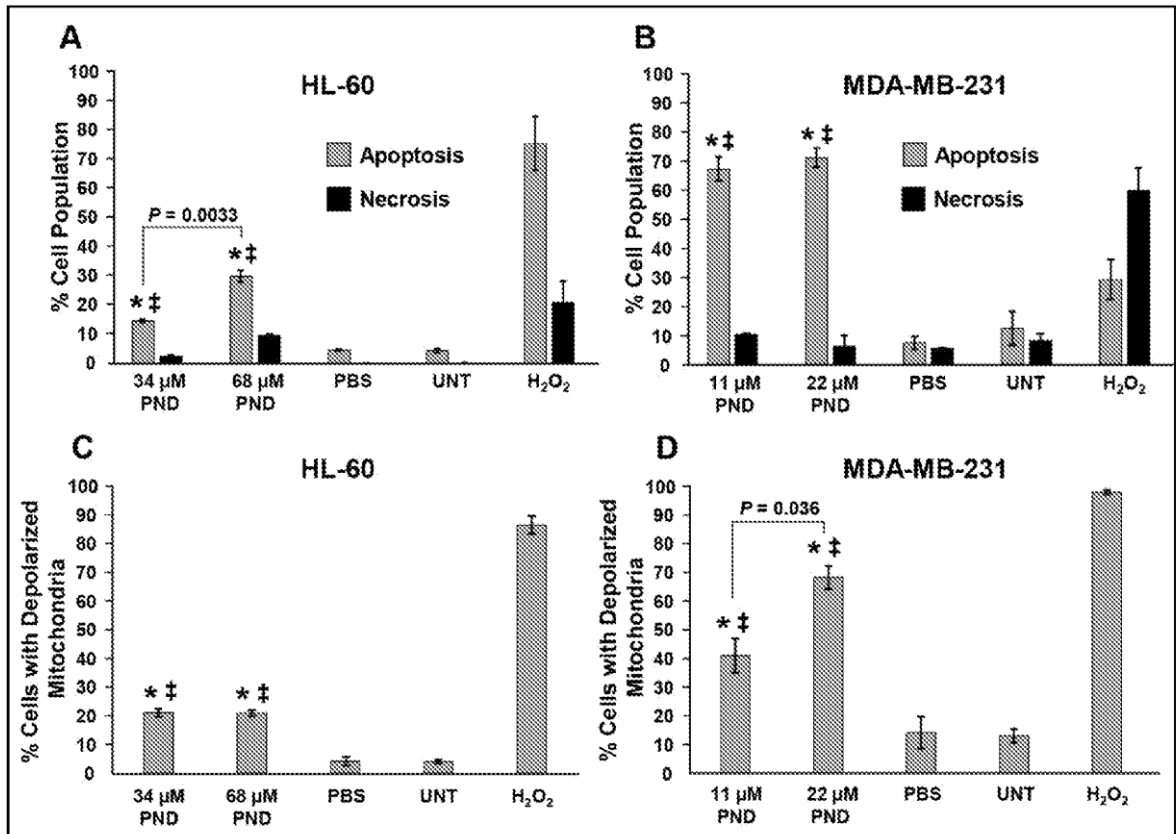


Figura 7

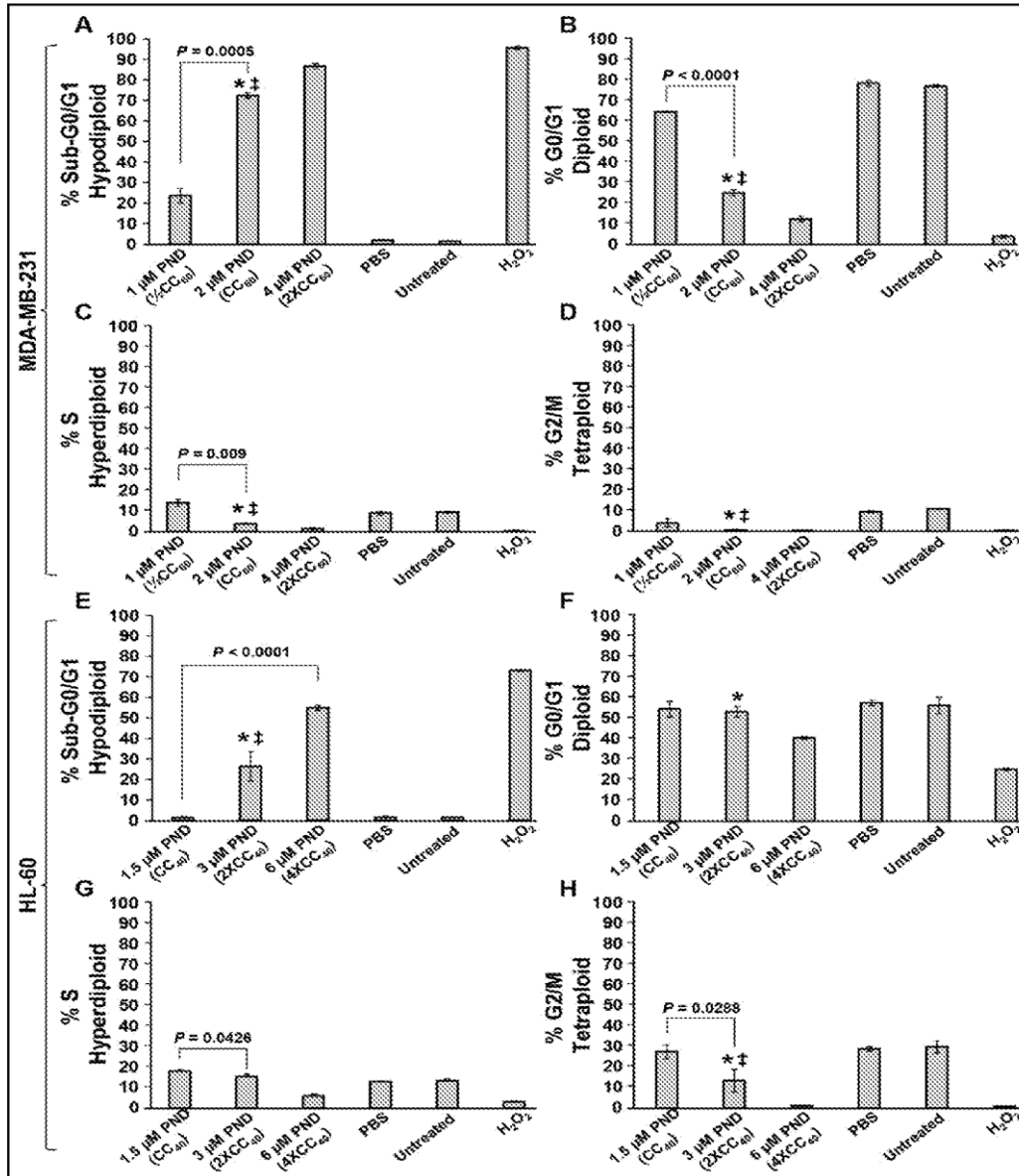


Figura 8

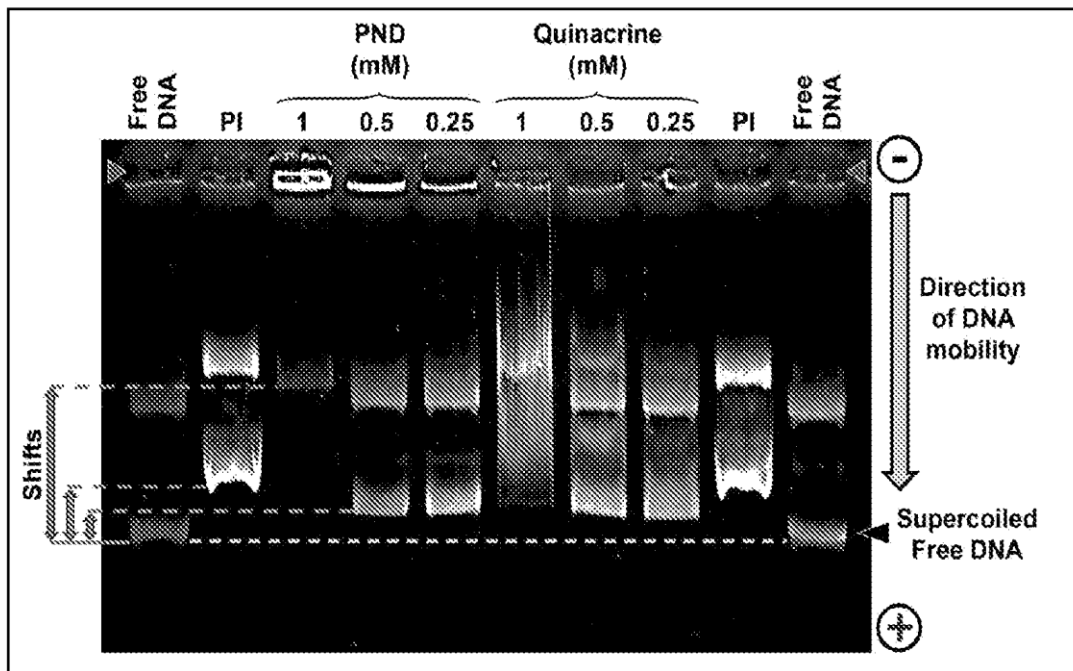


Figura 9

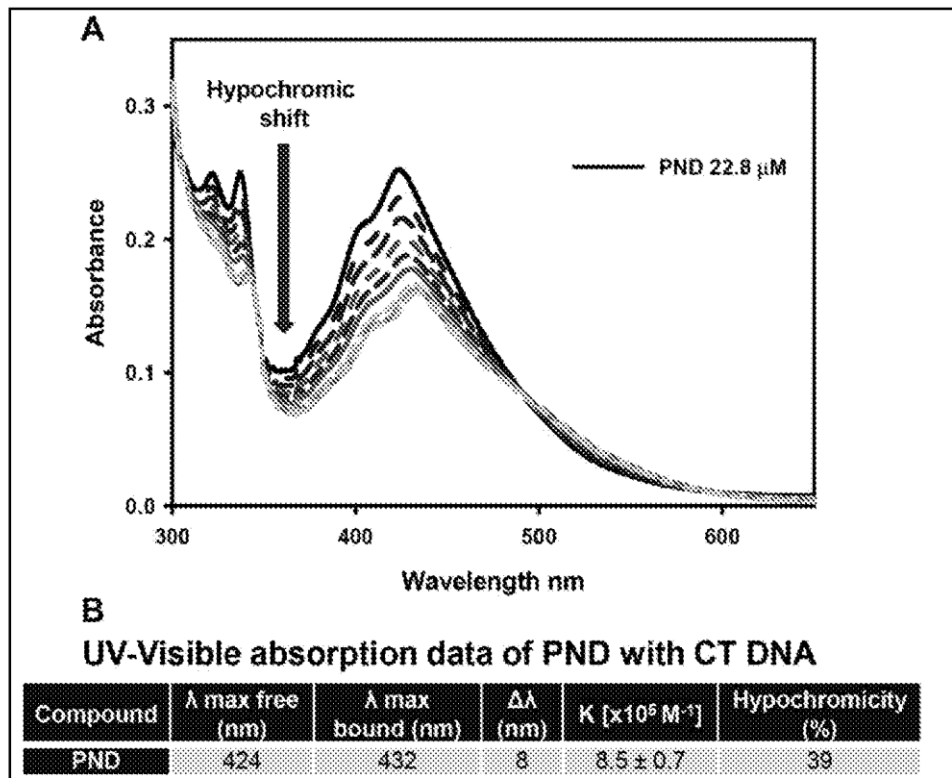


Figura 10

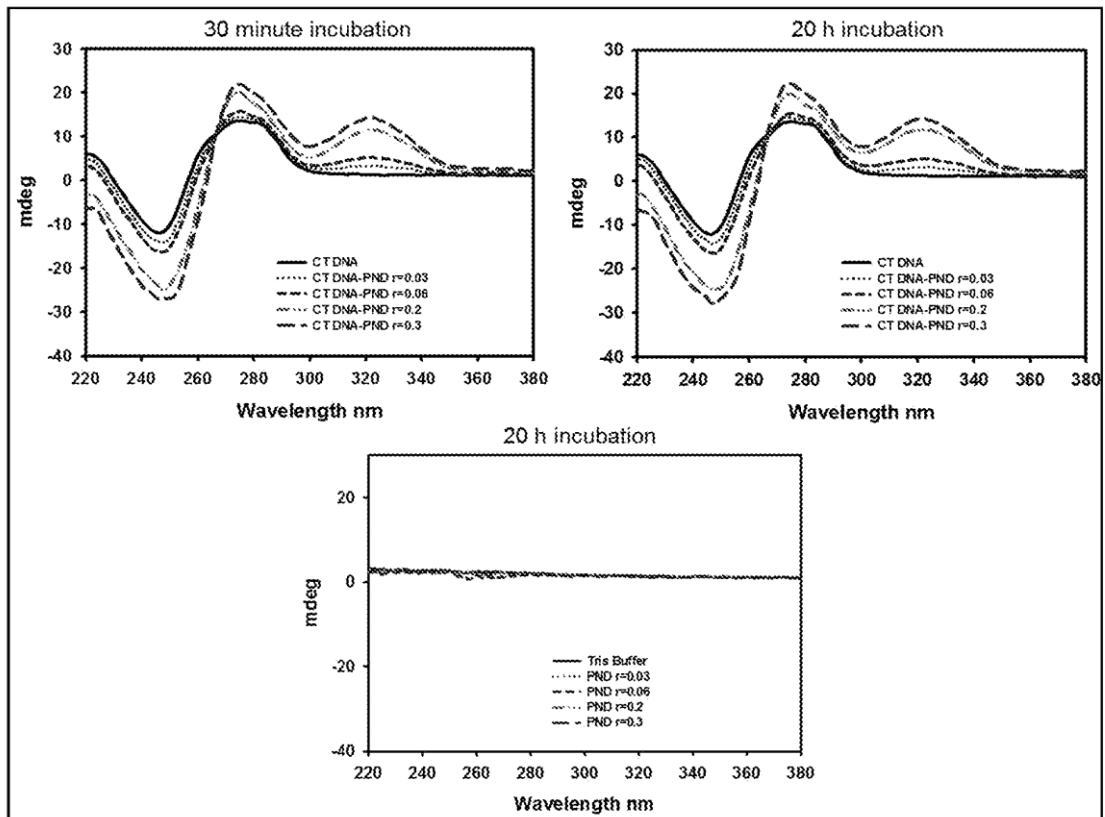


Figura 11

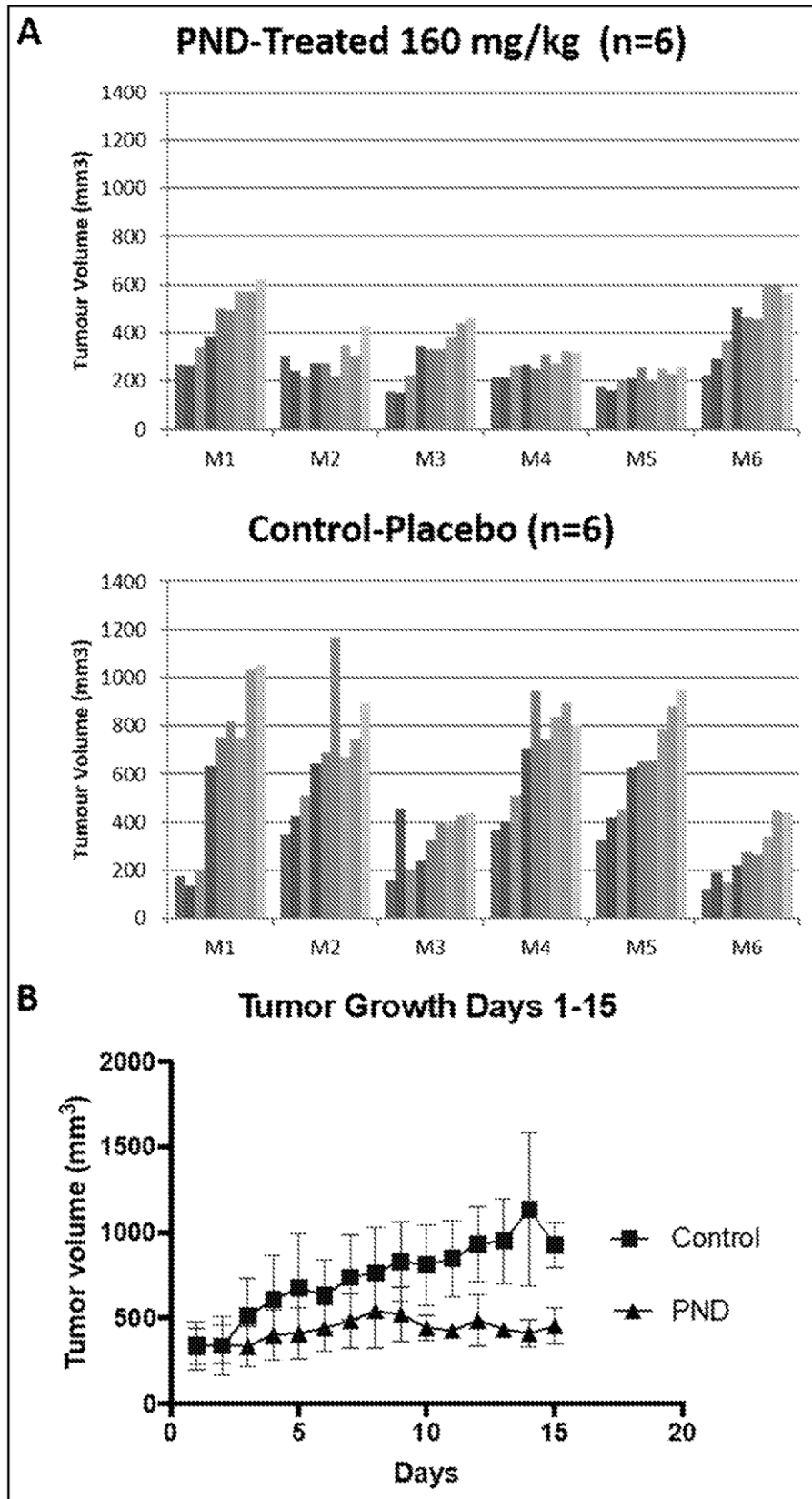


Figura 12

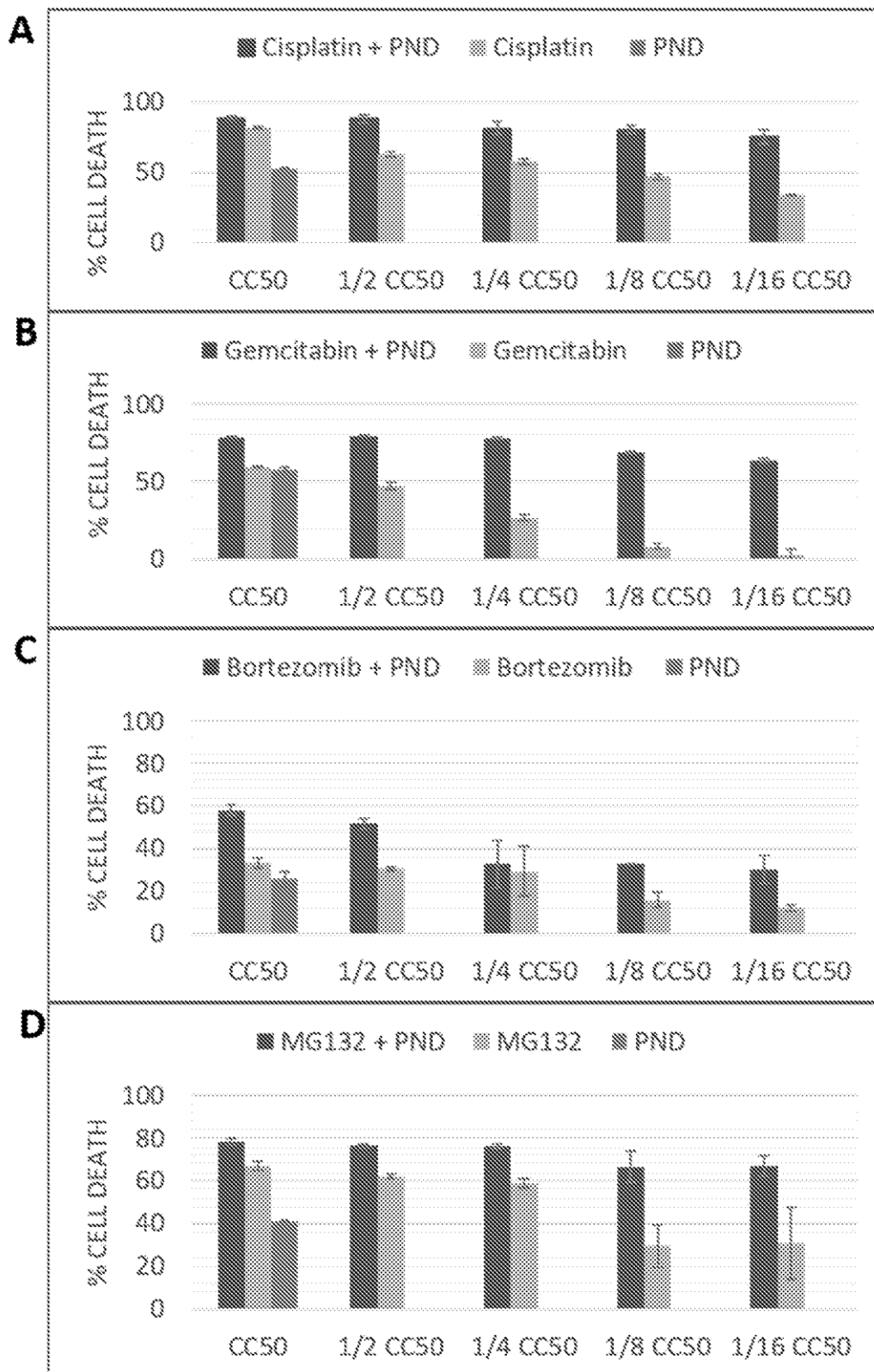


Figura 13

RESUMO**COMPOSIÇÕES BIFUNCIONAIS PARA O TRATAMENTO DE
CÂNCER**

A presente invenção refere-se ao uso de composições bifuncionais em métodos para o tratamento ou prevenção de câncer. As composições compreendem um ligante de DNA e um ligante de proteína para o tratamento ou prevenção de câncer, onde o ligante de DNA interfere com o metabolismo de DNA e o ligante de proteína interfere com as rotas de sinalização. Em particular, a presente invenção refere-se ao uso de pironaridina em métodos para o tratamento ou prevenção de câncer. A invenção refere-se também a composições, compostos e medicamentos compreendendo um ligante de DNA e um ligante de proteína, por exemplo, composições, compostos e medicamentos compreendendo pironaridina.