

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

(21) **PI0711210-6 A2**

(22) Data de Depósito: 21/05/2007  
(43) Data da Publicação: 27/09/2011  
(RPI 2125)



★ B R P I 0 7 1 1 2 1 0 A 2 ★

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/475  
C07D 471/04  
A61P 35/00

(54) **Título:** USO DE UM DERIVADO DE 9-HIDRÓXI ELIPTICINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, PRODUTO E DERIVADO DE 9-HIDRÓXI ELIPTICINA

(30) **Prioridade Unionista:** 22/05/2006 EP 06290822.3, 21/08/2006 US 60/838,860, 21/08/2006 US 60/838,860, 22/05/2006 EP 06290822.3

(73) **Titular(es):** BIOALLIANCE PHARMA, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.), ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

(72) **Inventor(es):** ANDRÉI MAKSIMENKO, CHRISTIAN AUCLAIR, VALÉRIE POLARD

(74) **Procurador(es):** ANA PAULA SANTOS CELIDONIO

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2007001307 de 21/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/135538de 29/11/2007

(57) **Resumo:** USO DE UM DERIVADO DE 9-HIDRÓXI ELIPTICINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, PRODUTO E DERIVADO DE 9-HIDRÓXI ELIPTICINA. A presente invenção refere-se ao uso de derivados de 9-hidróxi-elipticina para o tratamento de câncer. Derivados de 9-hidróxi-elipticina podem ser particularmente úteis para o tratamento de cânceres metastásicos ou cânceres que escapam de quimioterapias citotóxicas convencionais.

**“USO DE UM DERIVADO DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, PRODUTO E DERIVADO DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA”**

O presente pedido reivindica benefício ao pedido de patente do pedido provisório US 60/838.860 depositado em 21 de agosto de 2006, o conteúdo do qual é incorporado ao presente pedido por referência em sua totalidade, como se estivesse inteiramente descrito no presente.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

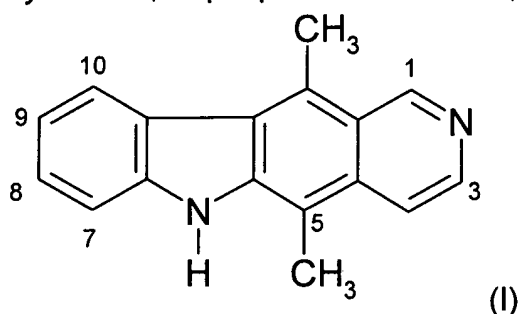
A presente invenção refere-se ao uso de derivados de 9-hidróxi-elipticina para o tratamento de câncer. Estes derivados de 9-hidróxi-elipticina podem ser particularmente úteis para o tratamento de cânceres metastásicos ou cânceres que escapam de quimioterapias citotóxicas convencionais.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Em células não-cancerígenas, a adesão a matriz extracelular e a células vizinhas desempenha um papel no controle da sobrevivência celular, crescimento, diferenciação e motilidade (K.A. Benigno et al., J. Cell Biol. 153 (2001), pp. 881–888; S.M. Frisch and R.A. Screaton, Curr. Opin. Cell Biol. 13 (2001), pp. 555–562 and F.M. Watt, EMBO J. 21 (2002), pp. 3919–3926). Mediante a transformação oncogênica, alterações profundas ocorrem na morfologia celular e a organização do citoesqueleto, na motilidade celular e no fator de crescimento ou proliferação celular dependente de adesão (para revisão vide G. Pawlak and D.M. Helfman, Curr. Opin. Genet. Dev. 11 (2001), pp. 41–47). O rompimento do citoesqueleto actina e uma redução concomitante no número de adesões locais são características comuns que acompanham a transformação celular induzida por vários oncogenes. O fato do citoesqueleto de actina desempenhar um papel fundamental na oncogênese é sugerido pela associação de crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade com a reorganização da rede de filamentos de actina observada em células transformadas (P. Kahn et al., Cytogenet. Cell Genet. 36 (1983), pp. 605–611).

Interações adesivas envolvem receptores de transmembrana especializados que são ligados ao citoesqueleto através de proteínas da placa de junção (para revisão vide Nagafuchi, Curr. Opin. Cell Biol. 13 (2001), pp. 600–603). A síntese de diversas proteínas de ligação de actina, incluindo  $\alpha$ -actinina, vinculina, tropomiosina e profilina, é regulada negativamente em células transformadas, e a sobreexpressão destas proteínas em células tumorais suprime o fenótipo transformado, que permite considerá-las com supressoras tumorais.

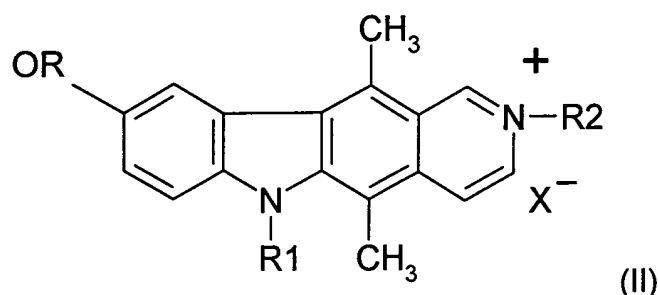
Elípticina é um produto alcalóide vegetal natural que foi isolado de plantas da família *Apocynaceae*, e que possui a fórmula (I):



Determinou-se que a elípticina possui atividade citotóxica e anticancerígena (Dalton et al., *Aust. J. Chem.*, 1967. 20, 2715).

Verificou-se que o derivado de elípticina hidroxilado na posição 9 (9-hidroxi-elípticínio) apresenta uma atividade antitumoral maior que elípticina em diversos experimentos tumorais (Le Pecq et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1974, 71, 5078-5082), mas apresenta uma atividade limitada para o tratamento de cânceres humanos (Le Pecq et al., *Cancer Res.*, 1976, 36, 3067).

Foram realizadas diversas pesquisas para identificar um derivado de elípticina apropriado para terapias humanas e direcionado à preparação de Celíptio ou N2-metil-9-hidróxi-elípticínio (NMHE), que foi utilizado para o tratamento de alguns cânceres humanos, em particular, para o tratamento de metástase óssea de cânceres de mama. Uma série de compostos derivados de 9-hidróxi-elípticina foi então desenvolvida e possuem a fórmula (II):



em que R e R1 são hidrogênio ou um grupo alquila, e R2 é um grupo alquila opcionalmente substituído, e X<sup>-</sup> é um ânion quaternizado. Estes compostos foram descritos na patente US 4.310.667.

A estrutura policíclica plana destes compostos foi verificada como capaz de interagir com o DNA através de intercalação. Adicionalmente, determinaram que estes compostos apresentam implicação em diversos modos de ação, incluindo ligação a DNA, geração de espécies de oxigênio oxidativas, e modificação da ação enzimática; de modo mais acentuado que a topoisomerase II e telomerase (vide, por exemplo, Auclair, 1987, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259, 1-14).

Farmacologicamente, o número de efeitos colaterais tóxicos tem se mostrado problemático. Em particular, determinou-se que elíptico induz a toxicidade renal. Entretanto, alguns derivados de elíptica, tais como cloreto de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielípticínio (Auclair et. al., 1987, *Cancer Research*, 47, 6254-6261), foram encontrados como apresentando atividades anticancerígenas e de segurança aprimoradas em animais. Apesar das propriedades aprimoradas de cloreto de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielípticínio tomarem o mesmo selecionado para os ensaios em fase I, o desenvolvimento deste composto foi então abandonado.

Outros derivados de 9-hidróxi-elíptica, tais como acetato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielípticínio, acetato de 2-(diisopropilamino-etil)-9-hidróxielípticínio e 2-(β-piperidino-2-etil)-9-hidróxielípticínio foram descritos, por exemplo, na patente US 4.310.667.

O desenvolvimento de drogas eficazes contra cânceres humanos

e que possuem efeitos colaterais limitados continua uma necessidade crítica. O desafio é, em particular, identificar drogas anticancerígenas que atuam, principalmente, através de um processo não-citotóxico. Neste campo de investigação, os inventores hipotetizaram que alterações no fenótipo celular, e mais particularmente na arquitetura do citoesqueleto, que é um dos principais mecanismos moleculares no desenvolvimento da progressão tumoral, poderiam ser um alvo pertinente no processo.

### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

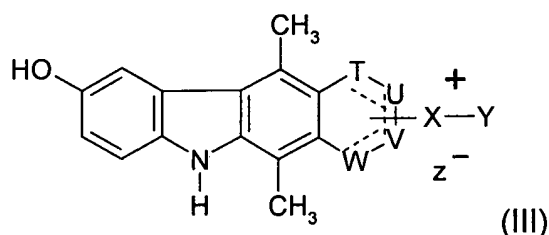
Os inventores demonstraram de forma inesperada que um número limitado de derivados de 9-hidróxi-elipticina possui atividade anticancerígena, que é mediada por um processo não-citotóxico (ou seja, não ligado diretamente aos danos biológicos na célula), induzindo o rearranjo da rede de actina, induzindo assim a reversão fenotípica de células tumorais graças ao resgate do controle de motilidade e adesão. Adicionalmente, a reversão fenotípica é obtida com concentrações não-citotóxicas, ou seja, concentrações que não apresentam efeito significativo na proliferação e sobrevivência celular.

Desta forma, os derivados de 9-hidróxi-elipticina identificados pelos inventores fornecem drogas anticancerígenas que atuam, principalmente, por meio de um processo não-citotóxico.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

#### DERIVADOS DE ELIPTICINA

Os derivados de 9-hidróxi-elipticina identificados como capazes de induzir a reversão de fenótipos malignos em concentrações não-citotóxicas possuem a fórmula (III):



opcionalmente na forma de um sal de adição de ácido,

em que:

X é um grupo alquila com 2 ou 3 átomos de carbono, opcionalmente ramificado, e opcionalmente substituído por OH, NRR', CN, OR, COOR, em que R e R' são, independentemente H ou um grupo alquila C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

Y é -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, independentemente H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ou R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> formam, junto com o átomo de N ao qual estão ligados, um heterociclo de 5 ou 6 membros, saturado ou insaturado, em que -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> pode estar na forma de um sal de amônio quaternário resultante da adição de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável, de forma que o composto de fórmula (I) esteja na forma de um sal de adição de ácido;

ou Y é um benzila, fenila ou uma arila com C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub> ou um grupo 5- ou 6-heteroarila;

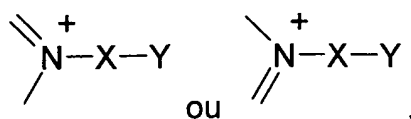
Z<sup>-</sup> é um anion de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável;

A cadeia lateral -X-Y é ligada a T, U, V ou W, conforme apropriado;

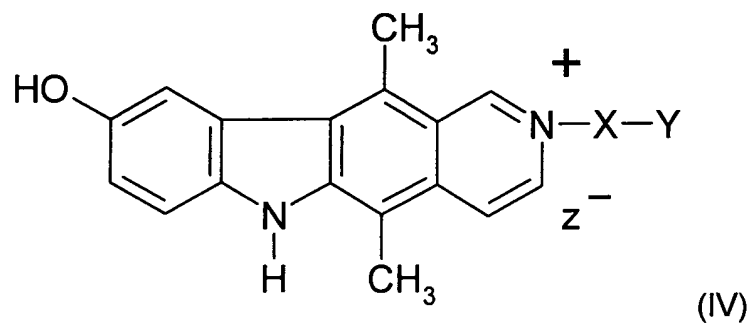
T, U, V e W são um átomo de C ou um átomo de N, de modo a formar um anel piridila e T, U, V e/ou W restantes são átomos de C,

contanto que a cadeia lateral -X-Y seja ligada a um de T, U, V e W sendo um átomo N,

ficando entendido que  $\overset{+}{\text{N}}$  representa tanto uma ligação simples quanto uma ligação dupla, conforme apropriado, de forma que o sistema formado com o anel piridila fundido seja aromático e seja formado o cátion resultante



De acordo com uma realização, derivados de 9-hidróxi-elipticina de acordo com a presente invenção apresentam a fórmula (IV):



em que

X é um grupo alquila com 2 ou 3 átomos de carbono, opcionalmente ramificado e opcionalmente substituído por OH, NRR', CN, OR, COOR em que R e R' são independentemente H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

Y é -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são independentemente H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ou N, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> formam juntos, opcionalmente, um heterociclo de 5 ou 6 membros, saturado ou insaturado, em que -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> pode estar na forma de um sal de amônio quaternário resultante da adição de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável, de forma que o composto de fórmula (I) esteja na forma de um sal de adição de ácido;

ou Y é um benzil, fenila ou um grupo arila com C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub> ou grupo 5- ou 6-heteroarila; e

Z<sup>-</sup> é um anion de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável.

Da forma utilizada no presente, "alquila" indica um grupo hidrocarboneto alifático que pode ser linear ou ramificado, possuindo cerca de 1 a 20 átomos de carbono na cadeia. Grupos alquila preferidos possuem de 1 a cerca de 12 átomos de carbono na cadeia, preferencialmente, 1 a 6 átomos de carbono. Ramificado indica que um ou grupos alquila inferiores, tais como metil, etil ou propil são ligados a uma cadeia alquila linear. "Alquila inferior" significa cerca de 1 a cerca de 4 átomos de carbono na cadeia que pode ser linear ou ramificada. A alquila pode ser substituída com um ou mais "substituintes de grupo alquila" que podem ser os mesmos ou diferentes, e

incluem, por exemplo, halo, cicloalquila, hidróxi, alcóxi, amino, acilamino, aroilamino, carbóxi.

“Arila” indica um sistema de anel aromático monocíclico ou multicíclico de cerca de 5 a cerca de 14 átomos de carbono, preferencialmente, de cerca de 6 a cerca de 10 átomos de carbono. A arila é opcionalmente substituída por um ou mais substituintes, que pode ser a mesma ou diferentes, e são definidas no presente. Exemplos de grupos arila incluem fenila ou naftila, ou fenila substituída ou naftila substituída.

Da forma utilizada no presente, o termo “heteroarila” refere-se a um anel de 5 a 14 membros, preferencialmente 5 a 10 membros, aromático hetero-, mono-, bi- ou multicíclico, que é formado pela remoção de um átomo de hidrogênio. Exemplos incluem pirrolil, piridil, pirazolil, tienil, pirimidinil, pirazinil, tetrazolil, indolil, quinolinil, purinil, imidazolil, tienil, tiazolil, benzotiazolil, furanil, benzofuranil, 1,2,4-tiadiazolil, isotiazolil, triazolil, tetrazolil, isoquinolil, benzotienil, isobenzofuril, pirazolil, carbazolil, benzimidazolil, isoxazolil, etc.

“Farmaceuticamente aceitável” indica que, dentro do escopo de julgamento médico, apropriado para uso em contato com as células de humanos e animais inferiores sem toxicidade indevida, irritação, resposta alérgica e similares e são mensurados com uma razão de risco/benefício razoável.

Um ácido orgânico ou inorgânico farmaceuticamente aceitável pode ser selecionado do grupo que consiste em ácido hidroclorídrico, hidrobromídrico, hidroiódico, sulfúrico, fosfórico, hexafluorofosfórico, nítrico, carbônico, cítrico, salicílico, metanosulfônico, acético, oxálico, maléico, fumárico, succínico, tartárico, aspártico, glutâmico, láctico, malônico, benzóico, ciclohexansulfâmico, e cinâmico. (Vide, por exemplo, S. M. Berge, et al., *Pharmaceutical Salts*, J. Pharm. Sci., 66: p.1-19 (1977)). Nas fórmulas gerais acima (III) e (IV):

- Z<sup>-</sup> é o anion carregado isoladamente correspondente que deriva do ácido acima.

Preferencialmente, nas fórmulas (III) e (IV) acima,  $Z^-$  é metanosulfonato (também denominado mesilato,  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ); e, adicionalmente

-  $\text{-NR}_1\text{R}_2$  pode estar na forma de um sal de amônio quaternário resultante da adição de um ácido orgânico ou inorgânico farmaceuticamente aceitável, conforme definido acima, preferencialmente, o ácido metanosulfônico, de forma que o composto de formula (I) possa apresentar duas cargas positivas.

Nos derivados de 9-hidróxi-elipticina acima, X é preferencialmente etil ou propil.

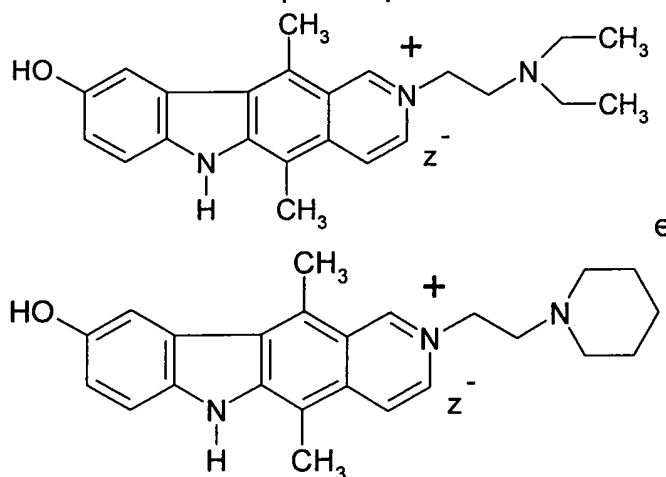
onde Y é um grupo arila, Y pode ser vantajosamente, selecionado do grupo que consiste de piridina e pirimidina,

em que Y é  $\text{-NR}_1\text{R}_2$ , vantajosamente, cada R1 e R2 pode ser um grupo etila, ou Y pode ser um grupo piperidina ou pirrolidina.

De acordo com determinadas realizações da presente invenção, X é etil, e Y é selecionado do grupo que consiste de dietilamino, pirrolidinil, benzil, fenil, piperidina, piridina e pirimidina.

Ainda, de acordo com determinadas realizações, X é propil e Y é selecionado do grupo que consiste em dietilamino, pirrolidinil, benzil, fenil, piperidina, piridina e pirimidina.

Derivados de 9-hidróxi-elipticina preferidos são conforme segue:

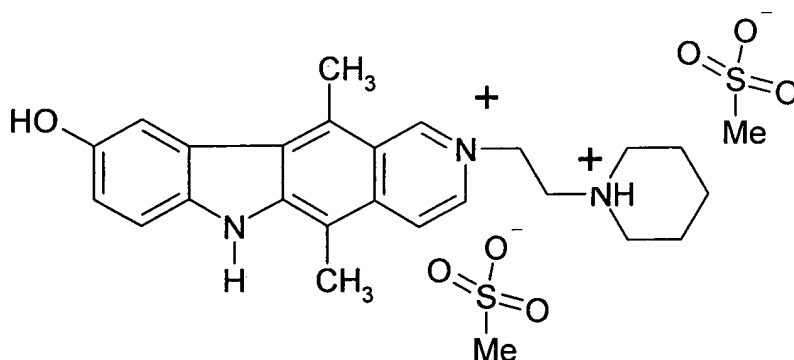


e seus sais de amônio quaternário resultante,  
em que  $Z^-$  é selecionado a partir dos anions carregados de forma isolada acima.

Mais especificamente, para o uso de acordo com a presente  
5 invenção, o derivado de 9-hidróxi-elipticina pode ser cloreto de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, metanosulfonato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, cloreto de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, metanosulfonato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio e seus sais de amônio quaternário resultantes.

10 Adicionalmente, derivados de 9-hidróxi-elipticina são metanosulfonato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, cloreto de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio e metanosulfonato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio e seus sais de amônio quaternários resultantes.

Mais particularmente, o derivado de 9-hidróxi-elipticina de acordo  
15 com a presente invenção é:



Métodos para a preparação de derivados de 9-hidróxi-elipticina foram descritos, por exemplo, na patente US 4.310.667.

#### MÉTODOS DE TRATAMENTO

Os derivados de 9-hidróxi-elipticina acima induzem o rearranjo do  
20 citoesqueleto actina em células tumorais, levando, desta forma, à redução da motilidade celular e recuperação da adesão celular. Este processo leva, *in vivo*, a apoptose seletiva de células tumorais resultante de diversos mecanismos,

incluindo eventualmente, de uma resposta imune do hospedeiro possivelmente envolvendo o efeito tóxico TCL.

Desta forma, a presente invenção refere-se ao uso de um derivado de 9-hidróxi-elipticina de fórmula (III) ou (IV) na fabricação de um medicamento destinado ao tratamento do câncer. A presente invenção refere-se ainda a um método de tratamento de câncer, por meio da reversão do fenótipo transformado de uma célula tumoral, que compreende a administração a um sujeito que necessite de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado de 9-hidróxi-elipticina, conforme descrito acima. Entretanto, neste uso e método, pode-se preferir que o derivado de 9-hidróxi-elipticina não seja cloreto de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, acetato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, acetato de 2-(diisopropilamino-etil)-9-hidróxielipticínio ou acetato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio.

A presente invenção refere-se adicionalmente ao uso de um derivado de 9-hidróxi-elipticina de fórmula (III) ou (IV) para a preparação de um medicamento destinado a reverter o fenótipo transformado de uma célula tumoral. A presente invenção refere-se ainda a um método de reversão de um fenótipo transformado de uma célula tumoral, que compreende a administração a um paciente que necessite de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado de 9-hidróxi-elipticina, conforme descrito acima.

Da forma utilizada no presente, o termo "sujeito" refere-se a um mamífero, tal como roedor, um felino, um cão, e um primata. Preferencialmente, o sujeito de acordo com a presente invenção é um humano.

No contexto da presente invenção, o termo "tratar" ou "tratamento", da forma utilizada no presente, refere-se à reversão, alívio, inibição do progresso de, ou prevenção da disfunção ou condição para a qual dito termo se aplica, ou um ou mais sintomas da dita disfunção ou condição.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma

quantidade do composto que seja suficiente para resultar na melhora resultar na melhora de um sintoma de uma disfunção ou condição específica. De forma vantajosa, o método de acordo com a presente invenção pode ser implementado utilizando quantidades não-citotóxicas de um derivado de 9-hidróxi-elipticina, ou seja, concentrações que não possuem qualquer efeito  
5      significante na proliferação celular e sobrevivência celular.

Da forma utilizada no presente, o termo “fenótipo transformado” refere-se a uma alteração que pode ocorrer (i) na morfologia celular, e/ou (ii) na organização do citoesqueleto, e/ou (iii) na motilidade celular, e/ou (iv) na  
10      proliferação celular dependente de adesão ou fator de crescimento. O mencionado fenótipo transformado é um marcador de células tumorais.

Exemplos de alterações na morfologia celular incluem células que exibem uma forma mais arredondada, menos extensões citoplasmáticas, menor área de difusão e contato célula/célula reduzido. Uma mudança na  
15      organização do citoesqueleto pode ser, em particular, uma quebra do citoesqueleto actina, que é tipicamente associado com uma redução concomitante no número de adesões focais.

“Reversão do fenótipo transformado de células tumorais” refere-se a fazer com que as células tumorais recuperem o fenótipo de uma célula  
20      normal (ou seja, não-tumoral) A reversão do fenótipo transformado por meio de derivados de 9-hidróxi-elipticina é, em particular, induzida pelo rearranjo da rede de actina.

A reversão do fenótipo transformado pode ser alcançada por um técnico no assunto pelo uso dos métodos de ensaio prontamente conhecidos  
25      no estado da técnica.

Os mencionados métodos incluem, por exemplo:

- ensaio de crescimento semi-sólido ou de Agar macio (ensaio de clonogenicidade);

- ensaio de motilidade celular;

- um método de mensurar actina estacionária polimerizada no lisado de células, conforme descrito no documento WO 2004/057337. Este método compreende de um índice de agressividade tumoral. Em resumo, o método compreende lisar as células sob condições que não causam desnaturação, ajustar a concentração de proteínas total do lisado, adicionar monômeros de actina marcados de forma fluorescente, e componentes necessários para a polimerização de actina endógena (tal como ATP), e mensuração de actina polimerizada;

- uma determinação das alterações morfológicas e organização do citoesqueleto de células por actina, zixina, actinina, ou B-catenina, por meio de marcação seguida de observação por microscopia de acordo com procedimentos convencionais.

O medicamento ou método de acordo com a presente invenção induz apoptose seletiva de células tumorais e, desta forma, fornece um método não-citotóxico de tratamento de câncer.

De acordo com a presente invenção, a célula tumoral pode ser uma célula originária de qualquer tumor, tal como tumor metastático ou primário, tumor sólido ou tumor de tecido macio, ou leucemia. Exemplos de células de tumor sólido ou macio incluem células de câncer de bexiga, mama, ossos, cérebro, cervical, coloretal, endometrial, renal, do fígado, do pulmão, do sistema nervoso, de ovário, de próstata, testicular, da tireóide, do útero, do pâncreas e de pele. Leucemias incluem, por exemplo, doenças mieloproliferativas crônicas, síndromes mielodisplásicas, leucemias não-linfocíticas agudas, leucemias linfocíticas agudas de célula B, leucemias linfocíticas agudas de células T, linfomas não de Hodgkin, e doenças linfoproliferativas crônicas.

Células tumorais que se esperam ser mais responsivas a

derivados de 9-hidróxi-elíptica são aquelas caracterizadas por um fenótipo invasivo associado com quebra do citoesqueleto, aumento da motilidade celular e/ou redução da adesão célula/célula, como pode ser observada em sarcoma agressivo e durante a transição mesenquimal-epitélio que ocorre na etapa inicial da metástase.

Uma vantagem da presente invenção consiste no fato de que além de sua capacidade de reverter o fenótipo maligno de uma célula, os derivados de 9-hidróxi-elíptica descritos no presente constituem verdadeiros agentes antiinvasivos. Assim, de acordo com uma realização, a célula tumoral é uma célula metastásica. Conseqüentemente, o medicamento ou método de acordo com a presente invenção pode ser destinado ao tratamento de metástase.

Adicionalmente, derivados de 9-hidróxi-elíptica conforme definidos no presente, possuem atividade anticancerígena mediada por um processo não-citotóxico. Estes compostos podem, vantajosamente, ser administrados para tratar câncer em um sujeito, escapando de quimioterapias citotóxicas convencionais com inibidores da replicação de DNA, tal como agentes de ligação de DNA, em particular, drogas intercalantes ou de alquilação, agentes antimetabólitos, tais como inibidores de DNA polimerase, ou inibidores de topoisomerase I ou II, ou com agentes antimitogênicos, tais como alcalóides. Os mencionados compostos citotóxicos incluem, por exemplo, actinomicina D, adriamicina, bleomicina, carboplatina, cisplatina, clorambucil, ciclofosfamida, doxorubicina, etoposídeo, 5-fluorouracila, 6-mercaptopurina melfalan, metotrexato, paclitaxel, taxotere, vinblastina, e vincristina.

Da forma utilizada no presente, o termo "sujeito que escapa de quimioterapia citotóxica" refere-se, em particular, a sujeitos nos quais as quimioterapias citotóxicas não modificam a progressão tumoral.

Um ou mais derivados de 9-hidróxi-elíptica, conforme definidos na presente invenção, podem ser administrados de forma simultânea ou

consecutiva ao sujeito a ser tratado.

Ainda, os derivados de 9-hidróxi-elipticina podem ser administrados em combinação (ou seja, de forma simultânea ou consecutiva) com um agente de diferenciação, em particular, com vitamina A, seus análogos  
5 sintéticos, e metabólitos (retinóides), vitamina D ou seus análogos, ou ligantes receptores ativados por proliferador de peroxisomo (PPAR).

Retinóides podem ser, por exemplo, todos os ácidos retinóicos (ATRA), N-(4-hidróxifenil) retinamida (4HPR), 13-*cis*-ácido retinóico (13-CRA), ou 9-*cis*-ácido retinóico (9-CRA).

10 Vitamina D ou seus análogos inclui, em particular, 25-dihidróxivitamina D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), que é um metabólito dihidróxilado normalmente formado a partir de vitamina D<sub>3</sub>, ou 1alfa-hidróxi-vitamina D<sub>3</sub>, 1alfa-hidróxi-vitamina D<sub>2</sub>, 1alfa-hidróxi-vitamina D<sub>5</sub>, derivados de vitamina D fluorados.

Ligantes PPAR são, em particular, ativadores de PPAR $\alpha$  ou  
15 PPAR $\gamma$ . Agonistas de PPAR $\gamma$  seletivos incluem TZDs clássicos (troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona, e ciglitazona; vide Forman et al., 1995, *Cell*, 83:803–812; Lehmann et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270:12953 –12956), e agonistas do tipo não-TZD. Representativos destes últimos incluem derivados de N-(2-benzoilfenil)-L-tirosina, tais como GW 1929, GI 262570, e GW 7845, que estão  
20 entre os agonistas de PPAR $\gamma$  mais potentes e seletivos, identificados até o desenvolvimento da invenção (vide Henke et al., 1998, *J. Med. Chem.*, 41:5020–5036; Cobb et al., 1998, *J. Med. Chem.*, 41:5055 –5069). GW 0207, um ácido 2,3-dissubstituído indol-5-ácido carboxílico, é também um agonista de PPAR $\gamma$  potente e seletivo (Henke et al., 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,  
25 9:3329–3334). Fibratos ou farnesol são exemplos de agonistas de PPAR $\alpha$ .

Portanto, derivados de 9-hidróxi-elipticina úteis de acordo com a presente invenção podem também ser misturados com outros compostos terapêuticos para formar composições farmacêuticas (com ou sem diluente ou

veículo) que, quando administrada, fornece administração simultânea de uma combinação de ingredientes ativos, resultando na terapia combinada da presente invenção. Em particular, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende um derivado de 9-hidróxi-elipticina de fórmula (III) ou (IV), e um agente de diferenciação, conforme definido acima.

Além da administração simultânea, os derivados de 9-hidróxi-elipticina úteis de acordo com a presente invenção podem ainda ser administrados de forma separada ou seqüencial com outro composto terapêutico, em particular, um agente de diferenciação conforme descrito acima. Desta forma, a presente invenção fornece, adicionalmente, um produto que compreende um derivado de 9-hidróxi-elipticina de fórmula (III) ou (IV), e um agente de diferenciação, como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial, para o tratamento de câncer, em particular, para a reversão do fenótipo transformado de uma célula tumoral.

Enquanto é possível para derivados de 9-hidróxi-elipticina serem administrados isoladamente, é preferível que os mesmos sejam apresentados como composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas, tanto veterinárias como para uso humano, úteis de acordo com a presente invenção, compreendem pelo menos um derivado de 9-hidróxi-elipticina conforme definido acima, em conjunto com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos.

Em algumas realizações preferidas, ingredientes ativos necessários na terapia combinada podem ser combinados em uma composição farmacêutica isolada para administração simultânea.

Da forma utilizada no presente, o termo "farmaceuticamente aceitável" e suas variações gramaticais, referindo-se a composições, veículos, diluentes e reagentes, são utilizados de forma intercambiável, e representa que os materiais são capazes de administração para ou mediante um mamífero,

sem a produção de efeitos fisiológicos indesejáveis, tais como náuseas, vertigens, problemas gástricos e similares.

A preparação de uma composição farmacológica que contém ingredientes ativos dissolvidos ou dispersos na mesma é bem conhecida dos técnicos no assunto e não precisa ser limitada com base na formulação. Tipicamente, tais composições são preparadas como injetáveis, tanto como soluções líquidas quanto suspensões; entretanto, formas sólidas apropriadas para solução ou suspensões, no líquido antes do uso, podem também ser preparadas. A preparação pode ainda ser emulsificada. Em particular, as composições farmacêuticas podem ser formuladas como forma de dosagem sólida, por exemplo, cápsulas, tabletes, pílulas, pós, drágeas ou grânulos.

A escolha do veículo e o teor da substância ativa no veículo são geralmente determinados de acordo com a solubilidade e propriedades químicas do composto ativo, o modo de administração específico e as ressalvas a serem observados na prática farmacêutica. Por exemplo, excipientes tais como lactose, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato dicálcico, e agentes de desintegração, tais como amido, ácidos algínicos, e determinados silicatos complexos combinados com lubrificantes, tais como estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio e talco podem ser utilizados para a preparação de tabletes. Para a preparação de cápsulas, é vantajoso utilizar lactose e polietilenoglicóis de alto peso molecular. Quando suspensões aquosas são utilizadas, elas podem conter agentes emulsificantes ou agente que facilitam a suspensão. Diluentes tais como sacarose, etanol, polietilenoglicol, propileno glicol, glicerol e clorofórmio, ou suas misturas, podem também ser utilizados.

As composições farmacêuticas podem ser administradas em uma formulação apropriada para humanos e animais, por meio de administração tópica ou sistêmica, incluindo oral, retal, nasal, bucal, sublingual, vaginal,

parenteral (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal e epidural), intracisternal e intraperitoneal. Será apreciado que a rota preferida pode variar com, por exemplo, a condição do receptor.

As formulações podem ser preparadas em forma de dosagem unitária por qualquer método bem conhecido no campo de farmácia. Tais métodos incluem a etapa de associar o ingrediente ativo com o veículo, que constitui um ou mais ingredientes ativos. Em geral, as formulações são preparadas por associar, de forma uniforme ou intimamente, o ingrediente ativo com veículos líquidos, ou veículos sólidos finamente divididos, ou ambos, e então, se necessário, moldar este produto.

A dose diária total de derivados de 9-hidróxi-elipticina administrada ao sujeito em doses únicas ou divididas pode ser em quantidades, por exemplo, de cerca de 0,001 a cerca de 100 mg/kg de peso corporal diariamente, e, de preferência, de 0,01 a 10 mg/kg/dia, particularmente, de 0,01 a 1 mg/kg/dia, preferencialmente, 0,1 a 1 mg/kg/dia, ou 1 a 10 mg/kg/dia. Exemplos de dosagens diárias são 0,05 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, e 10 mg/kg. Composições de dosagens unitária podem conter tais quantidades dos mencionados submúltiplos dos mesmos, como pode ser utilizado para produzir a dose unitária. Deve-se compreender, entretanto, que o nível de dosagem específico para qualquer paciente específico vai depender, mediante a variedade de fatores, incluindo peso corporal, saúde geral, sexual, alimentar, tempo e via de administração, taxas de absorção e excreção, combinação com outras drogas e a severidade da doença específica sendo tratada.

A presente invenção será adicionalmente ilustrada pelos exemplos a seguir.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A figura 1 ilustra a estrutura de BA016DD537 (cloreto de 2-( $\beta$ -

piperidinoetil)-9-hidróxielipticínio).

A figura 2 é uma representação do curso de tempo da estabilização de actina por BA016DD537 em extrato NIH 3T3 EF. BA016DD537 foi adicionado a tempo zero com tampão de polimerização e extrato NIH 3T3 EF. Misturas reativas continham BA016DD537 a concentrações simbolizadas conforme segue: 100 nM BA016DD537 (▲), 200 nM BA016DD537 (◆), controle de células NIH 3T3 EF malignas (▼), controle de células NIH 3T3 normais (■). Dados representam desvio padrão médio; n = 3.

A figura 3 é uma representação do curso de tempo da estabilização de actina por 100 nM BA016DD537 (◆), 200 nM BA016CA107 (□) e 200 nM BA016CA77 (\*) em extrato NIH 3T3 EF. As drogas foram adicionadas no tempo zero com tampão de polimerização e extrato NIH 3T3 EF. O controle de células NIH 3T3 EF malignas (Δ), e controle de células NIH 3T3 normais (○) são conforme exibidos. Os dados representam desvio padrão médio; n = 3.

A figura 4 é um exame por microscopia fluorescente das fibras de actina em células NIH 3T3 EF, tratadas ou não com BA016DD537, e comparadas com células NIH 3T3 controle. BA016DD537 aumenta as fibras de actina em células NIH 3T3 EF transformadas. Células NIH 3T3 normais e malignas foram analisadas por imunofluorescência *in situ* por meio do uso de FITC-faloidina para visualizar os filamentos de actina e Dapi para visualizar o núcleo. (A) Controle de células NIH 3T3 EF malignas; (B) Controle de células NIH 3T3 normais; (C) Células NIH 3T3 EF malignas tratadas com 100 nM BA016DD537; (D) Células NIH 3T3 EF malignas tratadas com 200 nM BA016DD537.

A figura 5 exibe as alterações morfológicas de células MIA PaCa-2 tratadas por BA016FZ539 (metanosulfonato de 2-(β-piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio). A: Controle, B: Células tratadas por 4 μM de BA016FZ539 por 3 dias (x200).

A figura 6 exibe o teste de proliferação de células B16BL6 tratadas com BA016DD537 (cloreto de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio) na presença ou ausência de 13CRA e ATRA. A concentração de ácidos retinóicos utilizada foi fixada a 10 nM.

5

## EXEMPLOS

### EXEMPLO 1

#### MODULAÇÃO DAS DINÂMICAS DE ACTINA

As dinâmicas da actina são conhecidas por estarem danificadas em células tumorais com uma redução subsequente da razão de F-actina para  
10 G-actina. As dinâmicas de actina foram quantificadas nos extratos de células tumorais utilizando o ensaio de anisotropia fluorescente com acesso de ganhos para constante razão de alongamento de F-actina ( $k$ ) e concentração de F-actina em estado estável ( $\Delta$  mA).

#### MATERIAIS E MÉTODOS

15 Todas as reações foram realizadas a 22°C e o sinal de anisotropia fluorescente foi recuperado a 520 nm com excitação a 490 nm em um Beacon 2000 (Panvera). Alexa 488 actina (Molecular Probes) foi centrifugada a 35 000 rpm por 2 h a 4°C para sedimentação de polímeros de actina residuais em uma ultra centrífuga Beckman L5-50B. A fluorescência  
20 remanescente no sobrenadante foi considerada como sendo devido aos monômeros ou filamentos de actina pequenos (5 -10 monômeros) que não formam pellets sob as condições descritas anteriormente. 80% do sobrenadante foi retirado; a concentração foi definida através de medições de fluorescência (excitação a 490 nm e recuperação de sinal a 520 nm).A  
25 concentração de actina ultra centrifugada foi calculada usando a actina Alexa 488 não ultra centrifugada como padrão. O sobrenadante foi aliquoteado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

Antes do experimento, uma alíquota de actina Alexa 488 ultra

centrifugada foi diluída a uma concentração de 1 mg/ml em tampão G (5 mM Tris pH 8,1, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 mM DTT, 0,2 mM ATP). 3  $\mu\text{l}$  da actina Alexa 488 diluída foi misturada em 168  $\mu\text{l}$  de tampão G e anisotropia de monômeros de actina foi mensurada antes da adição de 4  $\mu\text{l}$  de tampão de polimerização (2,5 M KCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 mM ATP), 5  $\mu\text{l}$  de tampão G na presença ou ausência da molécula química e 20  $\mu\text{l}$  de extrato celular de células NIH 3T3 normais ou células NIH 3T3 EF malignas a 2 mg/ml. A concentração final de actina Alexa 488 foi 4 nM. A razão actina não marcada para marcada foi de cerca de 140/4 nM. As medições foram realizadas a cada 10 s por 200 s. Os valores da anisotropia de monômeros de actina foram subtraídos, gerando o aumento de anisotropia ( $\Delta$  mA). Os dados foram combinados com a equação  $Y = Y_{\text{max}} \cdot [1 - \exp(-K \cdot X)]$ . As curvas começam em zero e aumentam para  $Y_{\text{max}}$ , que corresponde ao valor de anisotropia em estado estável ( $\Delta$  mA eq), com a constante razão K. Y valores de anisotropia dos quais anisotropia de monômeros é subtraída e X é o tempo.

### RESULTADOS

Os efeitos de BA016DD537 nestes parâmetros são:

**TABELA 1: EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE BA016DD537 NO AUMENTO DE ANISOTROPIA EM EXTRATOS DE NIH 3T3 EF**

|                  | <b>células<br/>NIH 3T3<br/>normais</b> | <b>células NIH<br/>3T3 EF<br/>malignas</b> | <b>Células NIH 3T3 EF<br/>malignas na presença de<br/>BA016DD537 a 100 nM</b> | <b>Células NIH 3T3 EF<br/>malignas na presença de<br/>BA016DD537 a 200 nM</b> |
|------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta$ mA      | 59,46                                  | 40,47                                      | 52,38                                                                         | 61,17                                                                         |
| $k \cdot s^{-1}$ | 0,1225                                 | 0,0960                                     | 0,1636                                                                        | 0,1737                                                                        |

O aumento na anisotropia foi observado para extrato NIH 3T3 EF na presença de cloreto de 2-( $\beta$ -piperidinoetil)-9-hidróxielipticínio (BA016DD537), conforme comparado com anisotropia mensurada na ausência de BA016DD537 (Figura 2).

Células NIH 3T3 EF exibem, conforme comparado com células NIH 3T3 nativas, menor razão constante pseudo de primeira ordem de alongamento de actina, bem como menos quantidade de F-actina em estado estável. Foi então assumido que frações citosólicas preparadas a partir de células NIH 3T3 EF são materiais convenientes para selecionar moléculas que podem modular dinâmicas de actina, incluindo aquelas que poderiam ligar preferencialmente filamentos de actina, tal como BA016DD537. Quando adicionadas ao meio de ensaio, BA016DD537 aumentam a constante de taxa de alongamento de actina -F e o valor de actina-F em estado estável. A Figura 2

exibe cinéticas típicas observadas seguindo a adição de concentrações aumentadas de BA016DD537. Na presença de 200 nM de BA016DD537, as dinâmicas de actina de frações citosólicas de NIH 3T3 EF são similares aquelas observadas usando frações citosólicas de NIH 3T3. Desta forma, BA016DD537 pode ser utilizada como agente promotor de polimerização de actina.

## **EXEMPLO 2**

### **MODULAÇÃO DE DINÂMICAS DE ACTINA E INIBIÇÃO EX VIVO DA MOTILIDADE CELULAR POR ACETATO DE 9-HIDRÓXI-2(B-ETIL)-ELIPTICÍNIO (BA016CA107) E ACETATO DE 9-HIDRÓXI-2(B-METIL)-ELIPTICÍNIO (CELÍPTIO, BA016CA77)**

Celíptio era conhecido como droga anticancerígena. O mecanismo de ação de acetato de 9-hidróxi-2( $\beta$ -etil)-elipticínio (BA016CA107) e Celíptio (BA016CA77) foi comparado com o de BA016DD537 por ensaio de medição de anisotropia de fluorescência em estado estável (materiais e métodos, exemplo 1). Sua habilidade de inibir a motilidade celular foi também investigada (materiais e métodos, exemplo 4).

## **RESULTADOS**

Conforme exibido na figura 3, BA016CA77 e BA016CA107 não aumentam a constante de taxa de alongamento de actina-F e o valor de actina-F em estado estável. Na presença de 200 nM de BA016CA77 ou BA016CA107,

as dinâmicas de actina de frações citosólicas de NIH 3T3 EF são similares às observadas utilizando frações citosólicas NIH 3T3 EF sem tratamento. Desta forma, BA016CA77 e BA016CA107 não podem ser utilizadas como agentes promotores da polimerização de actina.

5

### **TABELA 2**

#### **EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE BA016DD537, BA016CA77 E BA016CA107 NO**

#### **AUMENTO DE ANISOTROPIA EM EXTRATOS DE NIH 3T3 EF**

|             | <b>Células<br/>NIH 3T3<br/>normais</b> | <b>Células<br/>NIH 3T3<br/>EF<br/>malignas</b> | <b>Células NIH 3T3<br/>EF malignas na<br/>presença de<br/>BA016DD537 a<br/>200 nM</b> | <b>Células NIH 3T3<br/>EF malignas na<br/>presença de<br/>BA016CA107 a<br/>200 nM</b> | <b>Células NIH 3T3<br/>EF malignas na<br/>presença de<br/>BA016CA77 a<br/>200 nM</b> |
|-------------|----------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta mA$ | 59,46                                  | 40,47                                          | 61,17                                                                                 | 42,14                                                                                 | 38,33                                                                                |
| $k.s^{-1}$  | 0,1225                                 | 0,0960                                         | 0,1737                                                                                | 0,0280                                                                                | 0,0416                                                                               |

O comportamento de células malignas tratadas por drogas BA016CA77 e BA016CA107 também foi comparada àquele de células malignas não-tratadas em um ensaio de cicatrização. Células malignas tratadas migraram para além da delimitação do ferimento em sua área total (Figura 4). As células tratadas com drogas em concentrações não-citotóxica migraram da mesma forma, como as células malignas não tratadas.

Em conclusão, nem acetato de 9-hidróxi-2( $\beta$ -etil)-elipticínio ou acetato de 9-hidróxi-2( $\beta$ -metil)-elipticínio (Celíptio) foram ativos, indicando, desta forma, que a natureza da cadeia lateral na posição 2 desempenha um papel crítico na sua habilidade de modular dinâmicas de actina.

### **EXEMPLO 3**

#### **RESGATE DA REDE DE F-ACTINA EM CÉLULAS TUMORAIS**

20

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Células NIH 3T3 EF malignas foram semeadas em lamínulas de

vidro a uma densidade de 2000 células por cm<sup>2</sup>. No dia seguinte, BA016DD537 foi aplicado a células NIH 3T3 EF a várias concentrações de não citotoxicidade (100 nM e 200 nM). Após três dias, as células foram fixadas por 10 min em PBS contendo 3,7 % de formaldeído a 4°C antes do exame com microscopia fluorescente. A solução de formaldeído foi neutralizada com 50 mM NH<sub>4</sub>Cl. A extração foi realizada por 4 min com 0,4% Triton X-100 em PBS. As células foram incubadas por 1 h com tampão de bloqueio (3% de albumina de soro bovino em PBS), e então por 20 min com FITC-faloidina (Sigma) a temperatura ambiente. As lamínulas de vidro foram montadas em *Vectashieldk* (Zymed), e observados através de um microscópio de fluorescência (Nikon).

### RESULTADOS

A droga BA016DD537 em concentrações não-citotóxicas é capaz de reconstruir a rede de actina em células tumorais, conforme ilustrado na Figura 4. Células NIH 3T3 EF, tratadas com concentração não-citotóxica de BA016DD537, recuperam uma morfologia próxima da morfologia das células NIH 3T3: as células crescem, possuem numerosos contatos intracelulares e o citoesqueleto de actina é bem organizado em uma rede de fibras.

Em condições experimentais similares, acetato de 9-hidróxi-2-etil-elipticínio e acetato de 9-hidróxi-2(metil)-elipticínio (Celíptio) não foram ativos.

### EXEMPLO 4

#### INIBIÇÃO EX VIVO DA MOTILIDADE CELULAR

A invasão e metástase de célula tumoral, após pontos na progressão do câncer, claramente envolve a motilidade celular. O enigma central da motilidade celular, bem como alteração na forma celular geral, é o citoesqueleto e a componente chave do citoesqueleto envolvido na locomoção de células animais é actina. Conseqüentemente, a modulação da dinâmica de actina pode resultar na deficiência da motilidade celular, que por sua vez deve restringir a invasão e metástase.

Para estas razões, BA016DD537 foi testado em um teste de motilidade celular.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Ensaio de cicatrização foi realizado para avaliar o efeito de BA016DD537 na motilidade de células NIH 3T3 EF malignas e linhagens celulares B16F10 e B16BL6 de melanoma. Todas as células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> com umidade a 5%. Cerca de 100 000-200 000 células foram semeadas em uma placa de cultura de 6 cavidades e BA016DD537, sob diferentes concentrações, foi adicionada após 24 horas. As células foram crescidas por 3 dias até confluência de cerca de 90-95%, e pequenos arranhões (cerca de 200 µm - 1 mm de largura) foram realizados com uma pipeta. Os resíduos celulares foram removidos, então as culturas foram incubadas em meio completo por 10 h na presença das mesmas concentrações de BA016DD537. Então, as células foram fixadas por 10 min em PBS contendo 3,7 % formaldeído a 4°C. A cicatrização foi observada com um microscópio de luz de contraste de fase usando o Zeiss software.

### **RESULTADOS**

As células de melanoma invasivas B16F10 e B16BL6, bem como as células NIH-3T3 EF tumorigênicas que expressam a proteína de fusão EWS-FLI-1 exibem um alto fenótipo de motilidade. Para alcançar uma avaliação geral de suas propriedades de motilidade, foram comparados os comportamentos de células malignas tratadas com BA016DD537 com os comportamentos de células malignas não-tratadas em um ensaio de cicatrização. As células malignas não-tratadas migraram ao longo da borda do ferimento na sua área total. Em contraste, as células malignas tratadas com BA016DD537 não migraram para o ferimento. BA016DD537 inibiu a motilidade de células malignas de forma dependente da dosagem utilizada. O tratamento celular com BA016DD537 sob concentrações tão baixas quanto 50 nM resulta

na inibição completa de melanoma B16F10 e migração de células NIH 3T3 EF. Foi ainda observado inibição da motilidade de células B16BL6 por BA016DD537 em concentrações não-citotóxicas. Desta forma, o efeito da droga BA016DD537 selecionada é devido ao efeito tóxico.

5

### **EXEMPLO 5**

#### **EFEITO ANTIPROLIFERATIVO EX VIVO DE DERIVADOS DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA**

Células malignas apresentam a propriedade de crescer em meio semi-sólido, tal como metilcelulose, de uma maneira independente de ancoragem.

10

A atividade antitumoral de cloreto de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticinio (BA016DD537) e metanosulfonato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticinio (BA016FZ539) relacionados à reversão fenotípica foi mensurada pela inibição da formação de colônias em meio semi-sólido. Diversas linhagens celulares foram investigadas. A inibição da formação de colônia foi comparada à inibição da proliferação celular, conforme mensurada pela redução MTT.

15

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **ENSAIO DE CLONAGEM**

As células foram embebidas em meio de cultura completo suplementado com 0,8% metilcelulose (Methocel MC4000, Sigma), semeadas em triplicata em placas de 35-mm (Greiner Bio-one Ref 627102, Dominique Dutscher) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> com umidade de 5%. O número de células semeado foi de 1000 células por placa. Após uma a três semanas, de acordo com as linhagens celulares, clones macroscópicos foram contados.

20

#### **ENSAIO MTT**

Estudos de crescimento foram realizados utilizando ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (Sigma).

Cerca de 1500 a 5000 células, de acordo com a linhagem celular,

foram semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades, 24 horas antes da adição de concentrações crescentes de BA016DD537 ou BA016FZ539. A placa foi incubada a 37°C por 3 dias. 10 µl MTT de solução de estoque (5 mg/ml em solução salina de tampão fosfato) foram adicionados a 90 µl de meio complete em cada cavidade, a incubação foi continuada por 3 h a 37°C. 100 µl de tampão de lise (10 % dodecil sulfato de sódio, 1% HCl 1N; pH 4,7) foram adicionados a cada cavidade, e a placa foi incubada durante a noite. A absorbância foi determinada utilizando o sistema: Integrated EIA Management System (Labsystem) a um comprimento de onda de 570 nm. As taxas de proliferação foram calculadas a partir das leituras OD, utilizando as células não-tratadas como 100%.

Resultados típicos obtidos estão listados nas tabelas 3 a 6 abaixo.

**TABELA 3**

**INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BA016DD537**

|            | Efeito citotóxico (MTT) | Inibição da formação de colônia (metilcelulose) |
|------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| NIH 3T3 EF | IC50 = 400 nM           | IC50 = 30 nM                                    |
| B16F10     | IC50 = 500 nM           | IC50 = 35 nM                                    |

**TABELA 4**

**INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BA016FZ539**

**EM LINHAGENS CELULARES QUE EXPRESSAM PROTO-ONCOGENE EWS/FLI-1**

|            | Efeito citotóxico (MTT) | Inibição da formação de colônia (metilcelulose) |
|------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| NIH 3T3 EF | IC50 = 400 nM           | IC50 = 30 nM                                    |
| SK-N-MC    | IC50 = 840 nM           | IC50 = 205 nM                                   |

**TABELA 5**

**INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA**

**HUMANO E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BA016FZ539**

| Linhagens celulares de melanoma | Efeito citotóxico (MTT) | Inibição da formação de colônia (metilcelulose) |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| B16F10                          | IC50 = 500 nM           | IC50 = 35 nM                                    |
| B16BL6                          | IC50 = 212 nM           | IC50 = 29 nM                                    |
| A375                            | IC50 = 2.9 µM           | IC50 = 97 nM                                    |
| C9                              | IC50 = 2.1 µM           | IC50 = 132 nM                                   |
| 451 Lu                          | IC50 = 4.2 µM           | IC50 = 2 µM                                     |
| 1205 Lu                         | IC50 = 1.6 µM           | IC50 = 247 nM                                   |
| SKMEL28                         | IC50 = 10.7 µM          | IC50 = 515 nM                                   |
| HT144                           | IC50 = 9 µM             | IC50 = 125 nM                                   |

**TABELA 6**

**INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE PÂNCREAS HUMANO E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BA016FZ539**

| Linhagens celulares de pâncreas | Efeito citotóxico (MTT) | Inibição da formação de colônia (metilcelulose) |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| Mia Paca-2                      | IC50 = 7.6 µM           | IC50 = 640 nM                                   |
| PANC-1                          | IC50 = 22 µM            | IC50 = 4.3 µM                                   |

5      BA016DD537 e BA016FZ539 foram então determinados como desempenhando uma forte atividade inibitória na formação de colônia em meio semi-sólido. A inibição da formação de colônia ocorre a uma concentração não-proliferativa, conforme utilização do teste MTT.

**EXEMPLO 6****ATIVIDADE ANTITUMORAL**

10      A atividade antitumoral contra melanoma B16 pode ser determinada em camundongos utilizando enxerto de células malignas via i.p. seguido pelo tratamento i.p. Este tipo de protocolo, que ultrapassa diversos parâmetros de biodisponibilidade, gera uma informação aproximada na atividade

antitumoral máxima que pode ser esperada para um determinado tumor.

### PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Células B16 de melanoma ( $4 \times 10^5$ ) foram injetadas em camundongos B6D2F1 utilizando via i.p. a J0. Drogas, dissolvidas em água destilada estéril (0,5 ml), foram injetadas diariamente utilizando via i.p. bem conhecida de J1 a J9, sob diversas concentrações. Um camundongo controle recebeu apenas água destilada, de acordo com o mesmo protocolo.

Os camundongos tratados e controle foram contados diariamente. T/C (indica sobrevivência de camundongo tratado /sobrevivência média do camundongo controle) foi calculado a J9. T/C > 125% indica uma atividade antitumoral significativa.

Os resultados dos experimentos realizados estão resumidos na tabela 7 abaixo:

**TABELA 7**

**RAZÃO DA SOBREVIVÊNCIA MÉDIA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM CELÍPTIO OU BA016DD537 NA SOBREVIVÊNCIA MÉDIA DE CAMUNDONGOS CONTROLE (RAZÃO T/C)**

| Drogas                                                  | Dose (mg/kg/inj.) | T/C (%) |
|---------------------------------------------------------|-------------------|---------|
| Acetato de metil-2OH-9E (Celíptio)                      | 0,5               | 58      |
|                                                         | 0,25              | 122     |
|                                                         | 0,125             | 121     |
| Drogas                                                  | Dose (mg/kg/inj.) | T/C (%) |
| Acetato de $\beta$ -piperidinoetil-2 OH-9E (BA016DD537) | 10                | 87      |
|                                                         | 7,5               | 210     |
|                                                         | 6,25              | 196     |
|                                                         | 3,12              | 217     |
|                                                         | 1,56              | 168     |
|                                                         | 0,78              | 149     |
|                                                         | 0,39              | 133     |

Desta forma, BA016DD537 exibe atividade antitumoral considerável contra melanoma B16. A dose ótima de 3,12 mg/kg rende um T/C de 217%. A droga de referência Celíptio não apresenta qualquer atividade antitumoral significativa utilizando este protocolo.

5

### **EXEMPLO 7**

#### **ATIVIDADE ANTIMETASTÁSICA**

O fenótipo invasivo exibido por células de melanoma B16F10 de murino é caracterizado pela habilidade das células tumorais de formar de forma eficiente metástase no pulmão quando injetadas por via i.v. Com o intuito de  
10 determinar a propriedade antiinvasiva, foi testado o efeito de metanosulfonato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio neste processo.

#### **PROTOCOLO EXPERIMENTAL:**

100  $\mu$ l de uma suspensão celular B16F10 ( $4 \cdot 10^5$  células) foram injetados utilizando via i.v. no sinus retro-orbital de camundongo. A solução de  
15 metanosulfonato d2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio (BA016FZ539) foi administrada i.v no camundongo, 24 horas e 72 horas após a injeção celular, a uma dose de 5 mg/Kg (1º experimento) e 7,5 mg/kg (2º experimento). No grupo controle, camundongos foram injetados i.v. com soro fisiológico. Após sete dias, os camundongos foram sacrificados, os pulmões foram retirados, e  
20 nódulos metastásicos foram contados sob um microscópio de dissecação.

Tabela 8: Porcentagem de inibição de metástase pulmonar de células B16F10 por BA016FZ539:

|               | <b>Dose J1, J3<br/>(mg/kg/inj.)</b> | <b>Inibição do desenvolvimento de<br/>metástase pulmonar (% valores controle)</b> |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Experimento 1 | 5                                   | 21% (p = 0.0904)                                                                  |
| Experimento 2 | 7,5                                 | 39.6 % (p = 0.3269)                                                               |

Nas condições experimentais utilizadas, BA016FZ539 exibe uma atividade anti-invasiva significativa, conforme evidenciada pela redução

significativa de metástase do pulmão, seguido a injeção i.v. de células B16F10 de melanoma.

### **EXEMPLO 8**

#### **EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO *IN VITRO* DE DERIVADOS DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA EM**

##### **5 LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DO PULMÃO DE CÉLULAS PEQUENAS**

A atividade antitumoral de BA016FZ539 (metanosulfonato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio) foi determinada pela inibição da proliferação celular, conforme mensurada pelo teste de sulforodamina.

Três linhagens celulares de câncer de pulmão de células  
10 pequenas foram investigadas: NCI-H510, NCI-H446 e NCI-H187.

Cânceres de pulmão de células pequenas (SCLC) contados para 15–25% de todos os cânceres de pulmão diagnosticados a cada ano (Bonfill et al. 1975–1977 e 1987–1989. Int. J. Cancer 65: 751–754, 1996). Linhagens celulares SCLC podem ser subcontadas em 2 grupos maiores; linhagens celulares SCLC  
15 clássicas (NCI-H187 e NCI-H510), que expressam níveis elevados de marcadores neuroendócrinos, e linhagens celulares SCLC variantes falham ao expressar um ou mais dos marcadores neuroendócrinos.

Alguns estudos demonstraram que as linhagens celulares variantes, em contraste às linhagens celulares clássicas, são radio resistentes  
20 *in vitro* e possuem uma expressão aumentada de oncogene c-myc (Carney et al., Cancer Research 45, 2913-2923, Junho, 1985).

#### **MATERIAIS E MÉTODOS: ENSAIO SRB**

Estudos de crescimento foram realizados utilizando o ensaio colorimétrico de Sulforodamina B (SRB) (Sigma).

25 O ensaio SRB é utilizado para determinação da densidade celular com base na determinação do conteúdo protéico celular. Este método foi otimizado para seleção da toxicidade de compostos nas células aderente, em um formato de 96 cavidades (Skehan et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 1989, 30:2436).

Cerca de 50.000 células NCI-H510, NCI-H446 ou NCI-H187 foram semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades, enquanto adicionavam-se concentrações crescentes de BA016FZ539.

Após um período de incubação, monocamadas celulares são fixadas com 10 % (peso/vol) ácido tricloroacético e manchadas por 30 min, após o que o excesso de tinta é removido por lavagens repetidas com 1 % (vol/vol) de ácido acético. A tinta de ligação de proteína é dissolvida na solução base 10 mM Tris para determinação da densidade ótica (OD) a 510 nm, utilizando um leitor de micro placa.

As taxas de proliferação foram calculadas a partir da leitura OD, utilizando células não-tratadas como 100 %.

O ensaio de mancha da proteína SRB foi comparado com o ensaio colorimétrico de tetrazólio (MTT) para teste de quimiosensibilidade *in vitro* de diversas linhagens celulares de câncer de pulmão de célula pequena humano.

O teste SRB possui diversas vantagens sob o ensaio MTT. Por exemplo, alguns compostos podem interferir diretamente com a redução de MTT, sem apresentar qualquer efeito na viabilidade celular, enquanto a mancha de SRB é raramente afetada por este fenótipo de interferência. Adicionalmente, uma mancha de SRB é independente da atividade metabólica da célula.

## RESULTADOS

### TABELA 9

#### INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BA016FZ539 MENSURADA POR ENSAIO

##### SRB OU MTT (MEIO +/- SEM)

|          | Viabilidade 72h |               |
|----------|-----------------|---------------|
|          | IC50 (µM) SRB   | IC50 (µM) MTT |
| NCI-H510 | 5.8 +/- 1.9     | 14.8          |
| NCI-H446 | 22.4 +/- 6.7    | 9.8 +/- 0.2   |
| NCI-H187 | 16.9 +/- 6.8    | 7.9           |

Na tabela 9, pode-se observar que a linhagem celular SCLC variante (NCI-H446) exibe uma resistência melhor para BA016FZ539 do que linhagens celulares SCLC clássicas (NCI-H510 e NCI-H187).

### **EXEMPLO 9**

#### **5 EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO IN VITRO DE DERIVADOS DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER PANCREÁTICO**

A atividade antitumoral de BA016FZ539 (metanosulfonato de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio) foi medido pela inibição da proliferação celular, conforme mensurada pelo teste de sulforodamina.

10 Duas linhagens celulares de câncer de pâncreas foram investigadas: MIA PaCa-2 e PANC-1.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os efeitos de BA016FZ539 sob o crescimento de células pancreáticas MIA PaCa-2 e PANC-1 foram testados sobre uma faixa de  
15 concentração de 500  $\mu$ M a 0,16  $\mu$ M, e mensurados pelo uso de ensaio colorimétrico de SRB.

Cerca de 5000 células MIA PaCa-2 ou PANC-1 foram semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades, enquanto adicionam-se concentrações crescentes de BA016FZ539.

20 Alterações na configuração e número de linhagens celulares pancreáticas foram observadas sob observação microscópicas (Figura 5).

### **RESULTADOS**

#### **TABELA 10**

#### **INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR BA016FZ539 (MEIO +/- SEM)**

|            | Viabilidade 72h     |                     |
|------------|---------------------|---------------------|
|            | IC50 ( $\mu$ M) SRB | IC50 ( $\mu$ M) MTT |
| MIA PaCA-2 | 10.24 +/- 3.2       | 7.58 +/- 0.3        |
| PANC-1     | 20.68 +/- 2.9       | 22.02               |

A figura 5 exibe a reversão de um fenótipo transformado (Figura 5, A) para um fenótipo normal (Figura 5, B), por BA016FZ539 em linhagem celular MIA PaCa-2.

Este efeito foi observado apenas na linhagem celular MIA PaCa-2 e não na linhagem celular PANC-1. A reversão do fenótipo transformado é aqui associado com alterações na morfologia celular, incluindo mais extensões citoplasmáticas e o crescimento da área de difusão da célula. Desta forma, BA016FZ539 exibe uma atividade antitumoral melhor contra linhagem celular MIA PaCa-2 do que a linhagem celular PANC-1 (Tabela 10).

Em conclusão, os dados apresentados no presente mostram que o BA016FZ539 exibe múltiplos efeitos antitumorais em linhagens celulares de câncer humano. Determinou-se que BA016FZ539 inibe de forma significativa o crescimento celular em SCLC, e linhagens celulares pancreáticas com IC50 entre 6 e 20  $\mu$ M. Estes resultados sugerem ainda a capacidade de reverter o fenótipo maligno de uma linhagem celular pancreática, MIA PaCa-2. As mencionadas células tratadas com BA016FZ539 exibem alterações morfológicas que sugerem uma modificação na organização do citoesqueleto.

### **EXEMPLO 10**

#### **INIBIÇÃO EX VIVO DA MOTILIDADE CELULAR**

Os derivados de 9-hidróxi-elipticina podem ser administrados em combinação com um agente de diferenciação, em particular, com vitamina A, seus análogos sintéticos e metabólitos (retinóides), vitamina D ou seus análogos. Retinóides podem ser, por exemplo, todos os ácidos trans-retinóico (ATRA), N-(4-hidróxifenil) retinamida (4HPR), 13-cis-ácido retinóico (13CRA), ou 9-cis-ácido retinóico (9CRA).

Neste exemplo, a eficácia das combinações de BA016DD537 (cloreto de 2-( $\beta$ -piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio) com estes retinóides foi estudada.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

A inibição da viabilidade celular *ex vivo* por BA016DD537 na presença de retinóides 13CRA e ATRA foi testada contra linhagem celular de melanoma B16BL6 utilizando o ensaio colorimétrico de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo (MTT).

5                   Cerca de 1000 células foram semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades , 24 horas antes da adição de concentrações crescentes de BA016DD537, de 1 pM a 100 pM, na ausência ou na presença de 10 nM of retinóides. A placa foi incubada a 37°C por 3 dias. A solução de estoque 10 µl MTT (5 mg/ml na solução salina de tampão fosfato) foi adicionada a 90 µl de  
10                   meio completo em cada cavidade, a incubação foi continuada por 3 h a 37°C. 100 µl de tampão de lise (20% dodecilsulfato de sódio, 10 mM HCl, 1x PBS) foram adicionados a cada cavidade, e a placa foi incubada durante a noite. A absorbância foi determinada utilizando um sistema Integrated EIA Management System (Labsystem), a um comprimento de onda de 570 nm.

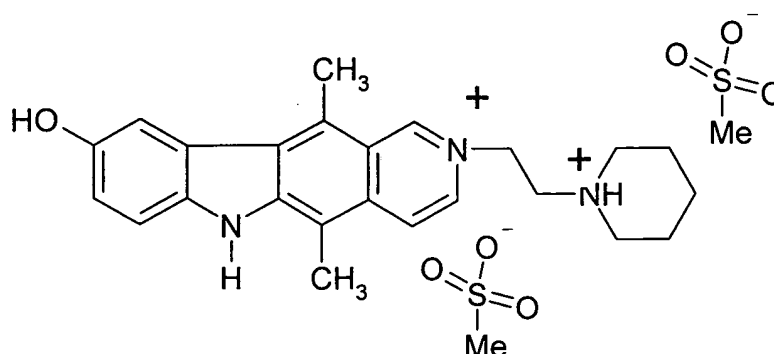
## 15                   RESULTADOS

Células de melanoma invasivo B16BL6 exibem um alto fenótipo invasivo. A necessidade por ensaio de sinergia foi para inibir a viabilidade celular tumoral sob as condições mais baixas de BA016DD537. Nenhuma inibição da viabilidade celular foi observada na presença de 10 nM de  
20                   retinóides 13CRA e ATRA , apenas. O tratamento celular com doses mais baixas de BA016DD537, na presença de 10 nM de retinóides resulta em uma inibição da viabilidade celular tumoral melhorada (Figura 6).

No mesmo momento, não foi observada qualquer atividade de BA016DD537 sob as mais baixas concentrações, na ausência de retinóide. A  
25                   eficácia de BA016DD537 a 100 nM, foi a mesma de 1 pM na presença de ATRA 10 nM. Desta forma, a dose de BA016DD537 pode ser reduzida em 100.000 vezes, quando utilizada em combinação com retinóides, para obter os mesmos resultados do que quando utilizado na ausência de retinóides.

**EXEMPLO 11****COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DOIS DERIVADOS 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA:****MONOMESILATO E BIMESILATO**

A atividade antitumoral de dois derivados de elipticina,  
 5 BA016FZ539 (2-(β-piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio metanosulfonato, ou  
 “monomesilato”), e o derivado de bimesilato correspondente



(a seguir, “bimesilato”), foram avaliados utilizando dois  
 experimentos independentes. A inibição da formação de colônias em meio  
 semi-sólido foi primeiro avaliada com o ensaio de clonagem na linhagem  
 10 celular B16F10 de melanoma murino.

A seguir, a proliferação celular de duas linhagens celulares  
 pancreáticas humanas (MIA PaCA-2 e PANC1), e uma linhagem celular de  
 melanoma murina (B16F10) foi quantificada na presença de monomesilato e  
 bimesilato, utilizando testes SRB e MTT.

15

**MATERIAIS E MÉTODOS****ENSAIO DE CLONAGEM**

As células foram embebidas em meio de cultura completo  
 suplementado com 0,8 % metilcelulose (Methocel MC4000, Sigma), semeadas  
 em triplicata em placas de 35-mm e incubadas a 37°C em uma atmosfera de  
 20 CO<sub>2</sub> com umidade de 5 %. O número de células semeadas foi de 1000 células  
 por disco. Após 9 dias, foram contados os clones macroscópicos da linhagem  
 celular B16F10 de melanoma murino.

### **TESTES MTT E SRB**

Estudos de crescimento foram realizados utilizando o ensaio colorimétrico MTT e SRB (Sigma). Cerca de 1500 de células pancreáticas B16F10 ou 3000 células pancreáticas (MIA PaCa-2 and PANC1) foram

5 semeadas em uma placa de cultura de 96 cavidades antes da adição de concentrações crescentes de monomesilato ou bimesilato.

As placas foram incubadas a 37°C por 3 dias, e então foram tratadas dependendo dos protocolos SRB ou MTT (vide materiais e métodos).

Nestes dois casos, as taxas de proliferação foram calculadas a

10 partir da leitura de OD, utilizando as células não tratadas como 100%.

### **RESULTADOS**

#### **TABELA 11**

##### **INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR:**

| <b>Linhagens<br/>celulares</b> | <b>IC50 (SRB Teste-72h)</b> |            | <b>IC50 (MTT Teste-72h)</b> |            |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|
|                                | Monomesilato                | Bimesilato | Monomesilato                | Bimesilato |
| B16F10                         | 4.3 µM                      | 1.8 µM     | 2 µM                        | 2.8 µM     |
| Mia Paca-2                     | 5.6 µM                      | 2.5 µM     | nd                          | nd         |
| PANC-1                         | 50.4 µM                     | 37.6 µM    | nd                          | nd         |

Nd: não determinado

15 B16F10 foi testado com ensaios SRB e MTT, enquanto PANC1 foi investigado apenas com o ensaio SRB. Não existem diferenças significativas entre o IC50 de monomesilato e bimesimato.

#### **TABELA 12**

##### **INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DA COLÔNIA DE B16F10**

|              | <b>B16F10 inibição de formação de colônia</b> |
|--------------|-----------------------------------------------|
| Monomesilato | IC50 = 67 nM                                  |
| Bimesimato   | IC50 = 21 nM                                  |

20 Ambos monomesilato e bimesilato exibiram concentração inibitória

similar de 50 % (IC50) na formação de colônia em meio semi-sólido, respectivamente, 67 e 21 nM.

Efeitos inibitórios significativos no crescimento de linhagem celular B16F10 de melanoma murino invasivo foram efetivamente obtidos em metilcelulose  
5 na presença destas mencionadas duas drogas.

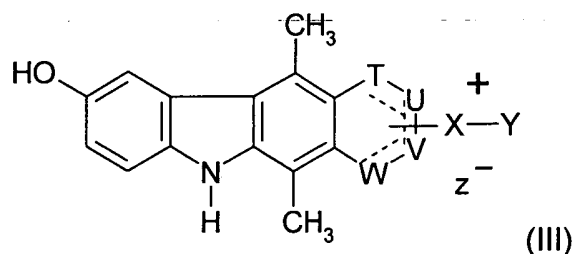
Os resultados obtidos confirmam ainda que a inibição da formação de colônia ocorre sob concentrações não-proliferativas , conforme medidas usando teste MTT (Tabela 12).

Em conclusão, monomesilato e bimesilato possuem a mesma  
10 atividade biológica, com relação aos resultados obtidos a partir do ensaio de clonagem e testes de proliferação celular.

Juntos, estes dados sugerem fortemente que derivados de elipticina possuem potencial para o desenvolvimento como um agente antitumoral.

### REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UM DERIVADO DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA de fórmula (III):



opcionalmente na forma de um sal de adição de ácido,

em que:

X é um grupo alquila com 2 ou 3 átomos de carbono, opcionalmente ramificado e opcionalmente substituído por OH, NRR', CN, OR, COOR, em que R e R' são, independentemente, H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

Y é -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, independentemente, H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ou R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> formam, junto com o átomo de N ao qual estão ligados, um heterociclo de 5 ou 6 membros, saturado ou insaturado, em que -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> pode estar na forma de um sal de amônio quaternário resultante da adição de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável, de forma que o composto de fórmula (I) esteja na forma de um sal de adição de ácido;

ou Y é um grupo benzila, fenila ou arila com C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub> ou 5- ou 6-heteroarila; e

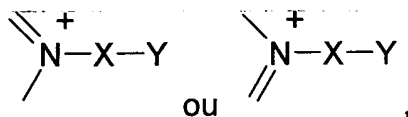
Z<sup>-</sup> é um ânion de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável;

a cadeia lateral -X-Y é ligada tanto a T, U, V ou a W, conforme apropriado;

T, U, V e W são um átomo de C ou um átomo de N, de modo a formar um anel piridila e T, U, V e/ou W restantes são átomos de C,

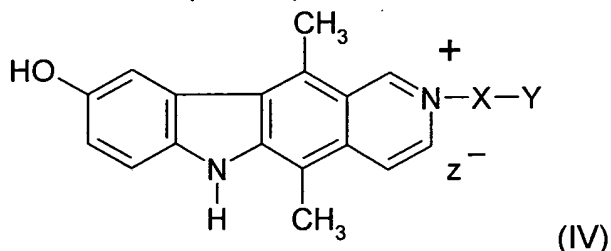
contanto que a cadeia lateral -X-Y seja ligada a um de T, U, V e W sendo um átomo de N,

ficando entendido que  $\text{---}$  representa tanto uma ligação simples quanto uma ligação dupla, conforme apropriado, de forma que o sistema formado com o anel piridila fundido seja aromático e seja formado o cátion resultante



5 caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento destinado ao tratamento de câncer.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do derivado de 9-hidróxi-elipticina possuir a fórmula (IV):



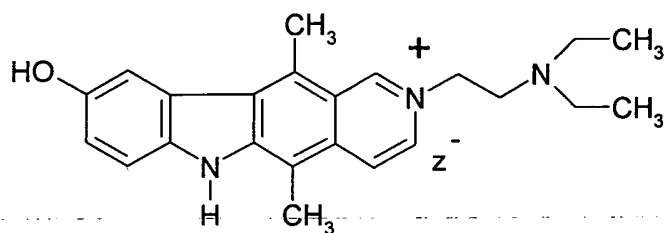
opionalmente na forma de um sal de adição de ácido, em que X, Y e Z<sup>-</sup> são conforme definidos na reivindicação 1.

10 3. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que X é etila ou propila.

4. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que Y é -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, e cada R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> é um grupo etila, em que -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> pode estar na forma de um sal de amônio quaternário resultante da adição de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável, de forma que o composto de fórmula (I) esteja na forma de um sal de adição de ácido.

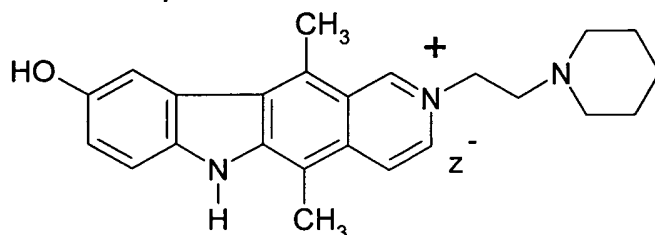
5. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que Y é selecionado do grupo que consiste de piperidina, pirrolidinila, piridina e pirimidina e seus sais de amônio quaternário.

6. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o derivado de 9-hidróxi-elipticina é



ou seus sais de amônio quaternário resultantes.

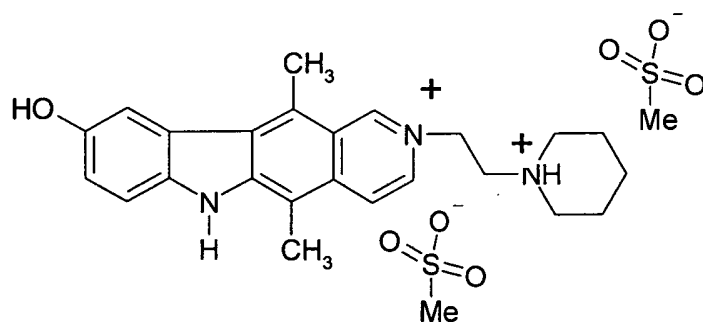
7. USO, de acordo com uma das reivindicações 1, 2, 3 e 5, caracterizado pelo fato de que o derivado de 9-hidróxi-elíptica é



ou seus sais de amônio quaternário resultantes.

5 8. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que Z<sup>-</sup> é metanosulfonato.

9. USO, de acordo com uma das reivindicações 1, 2, 3, 5 e 7, caracterizado pelo fato de que o derivado de 9-hidróxi-elíptica é:



10 10. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o medicamento destina-se a reversão do fenótipo transformado de uma célula tumoral.

11. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que dita célula tumoral apresenta fenótipo invasivo.

15 12. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que dito medicamento destina-se ao tratamento de

metástase.

13. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que dito medicamento destina-se ao tratamento de câncer em um sujeito que escapa de quimioterapia citotóxica.

5 14. USO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que dito medicamento é administrado em combinação com um agente de diferenciação.

15. USO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que dito agente de diferenciação é selecionado do grupo que consiste de  
10 vitamina A e seus análogos sintéticos, retinóides, vitamina D e seus análogos, e ligantes de receptores ativados por proliferador de peroxisomo (PPAR).

16. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de que compreende um derivado de 9-hidróxi-elipticina de fórmula (III) ou (IV), conforme definido em uma das reivindicações 1 a 9, e um agente de  
15 diferenciação, em um veículo farmaceuticamente aceitável.

17. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que dito agente de diferenciação é selecionado do grupo que consiste de vitamina A e seus análogos sintéticos, retinóides, vitamina D e seus análogos e ligantes de receptores ativados por proliferador  
20 de peroxisomo (PPAR).

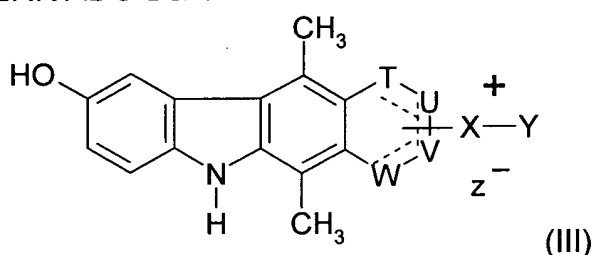
18. PRODUTO, caracterizado pelo fato de que compreende um derivado de 9-hidróxi-elipticina de fórmula (III) ou (IV), conforme definido em uma das reivindicações 1 a 9, e um agente de diferenciação, como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial no  
25 tratamento de câncer.

19. PRODUTO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que ser como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial na reversão de fenótipo transformado de

uma célula tumoral.

20. PRODUTO, de acordo com uma das reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que dito agente de diferenciação é selecionado do grupo que consiste em vitamina A e seus análogos sintéticos, retinóides, vitamina D e seus análogos, e ligantes de receptores ativados por proliferador de peroxisomo (PPAR).

21. DERIVADO DE 9-HIDRÓXI-ELIPTICINA de fórmula (III):



opcionalmente na forma de um sal de adição de ácido, caracterizado pelo fato de que:

10 X é um grupo alquila com 2 ou 3 átomos de carbono, opcionalmente ramificado e opcionalmente substituído por OH, NRR', CN, OR, COOR, em que R e R' são, independentemente, H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

Y é -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são, independentemente, H ou um grupo alquila com C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ou R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> formam, junto com o átomo de N ao qual estão ligados, um heterociclo de 5 ou 6 membros, saturado ou insaturado, em que -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> pode estar na forma de um sal de amônio quaternário resultante da adição de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável, de forma que o composto de fórmula (I) esteja na forma de um sal de adição de ácido;

20 ou Y é um grupo benzila, fenila ou arila com C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub> ou 5- ou 6-heteroarila; e

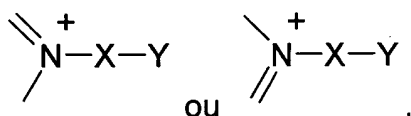
Z<sup>-</sup> é um ânion de um ácido orgânico ou inorgânico farmacologicamente aceitável;

a cadeia lateral -X-Y é ligada tanto a T, U, V ou W, conforme apropriado;

T, U, V e W são tanto um átomo de C como um átomo de N, de modo a formar um anel piridila, e T, U, V e/ou W restantes são átomos C,

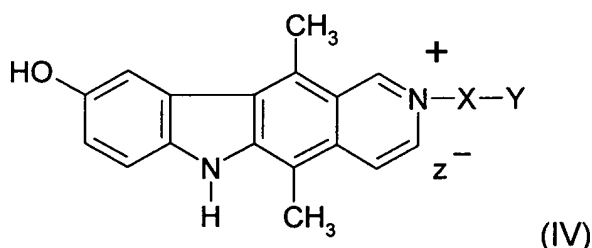
contanto que a cadeia lateral -X-Y seja ligada a um de T, U, V e W sendo um átomo de N,

5 ficando entendido que  $\text{---}$  representa tanto uma ligação simples quanto uma ligação dupla, conforme apropriado, de forma que o sistema formado com o anel piridila fundido seja aromático e seja formado o cátion resultante



contanto que dito derivado de 9-hidróxi-elipticina não seja cloreto de 2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, acetato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-  
10 hidróxielipticínio, acetato de 2-(diisopropilamino-etil)-9-hidróxielipticínio ou acetato de 2-(β-piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio.

22. DERIVADO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que dito derivado de 9-hidróxi-elipticina possui a fórmula (IV):



15 opcionalmente na forma de um sal de adição de ácido,  
em que X, Y a Z<sup>-</sup> são conforme definidos na reivindicação 19, e  
desde que dito derivado de 9-hidróxi-elipticina não seja cloreto de  
2-(dietilamino-2-etil)-9-hidróxielipticínio, acetato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-  
hidróxielipticínio, acetato de 2-(diisopropilamino-etil)-9-hidróxielipticínio ou  
20 acetato de 2-(β-piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio.

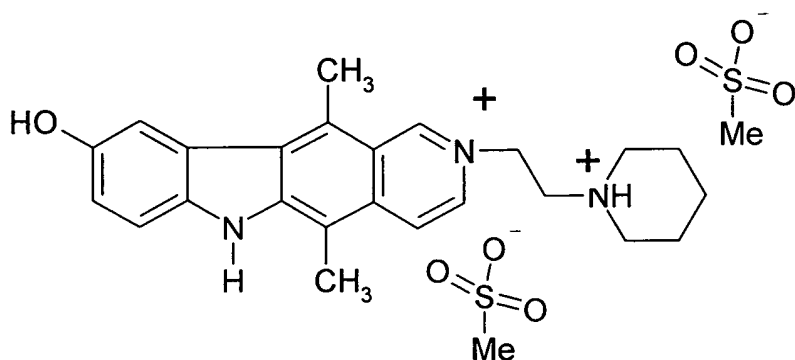
23. DERIVADO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que X é etila e Y é piperidina, contanto que dito

derivado de 9-hidróxi-elipticina não seja acetato de 2-(β-piperidino-2-etil)-9-hidróxielipticínio.

24. DERIVADO, de acordo com uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que é metanosulfonato de 2-(β-piperidino-2-etil)-

5 9-hidróxielipticínio ou seus sais de amônio quaternário resultantes.

25. DERIVADO, de acordo com uma das reivindicações 21 a 24, caracterizado pelo fato de que é



26. DERIVADO, de acordo com uma das reivindicações 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que é metanosulfonato de 2-(dietilamino-2-etil)-9-

10 hidróxielipticínio ou seus sais de amônio quaternário resultantes.

27. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de que compreende um derivado de 9-hidróxi-elipticina conforme descrito em uma das reivindicações 21 a 26, em um veículo farmaceuticamente aceitável.

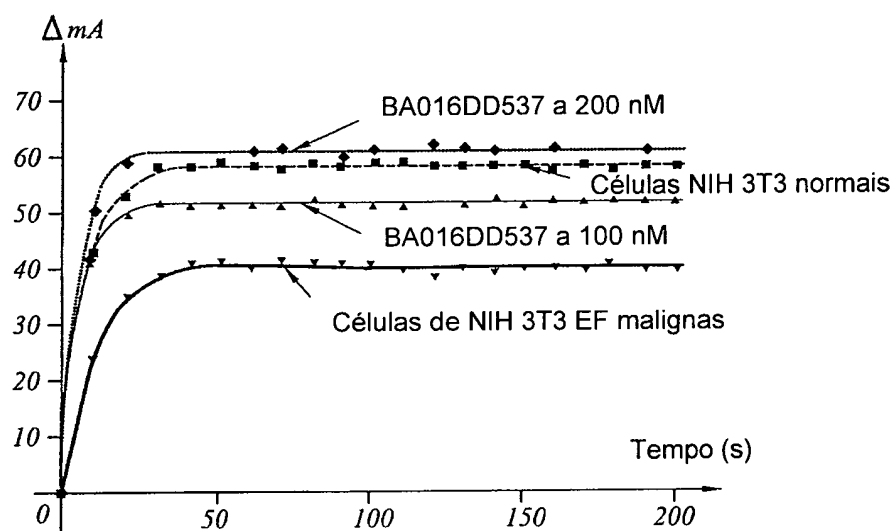
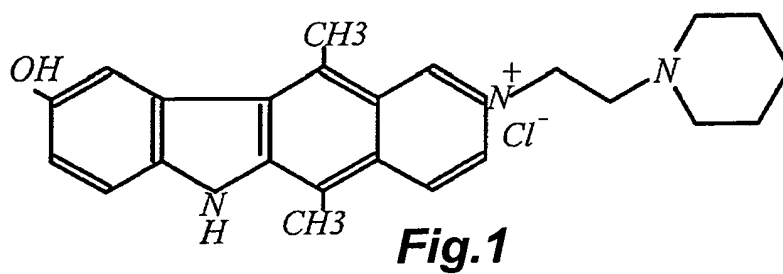
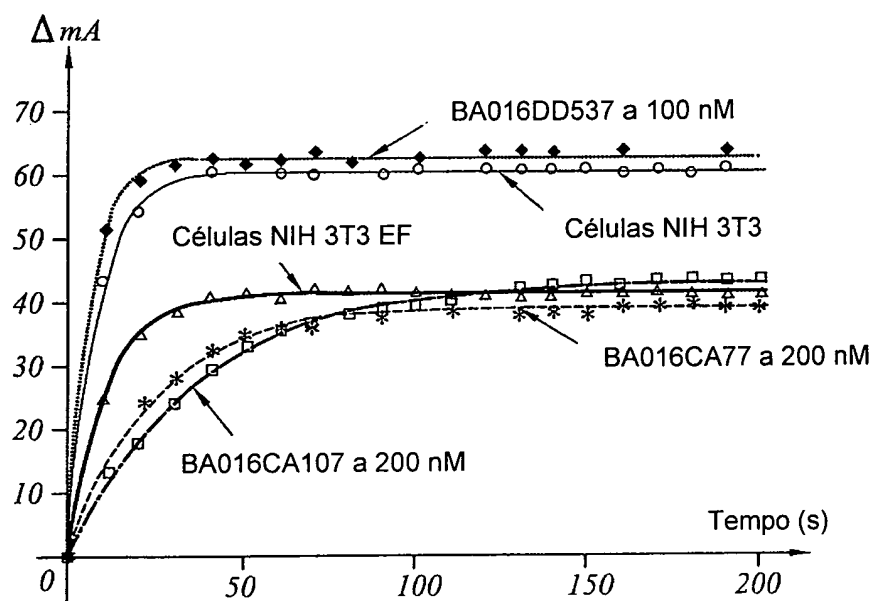
**Fig.2****Fig.3**



**Fig 4A**



**Fig.4B**

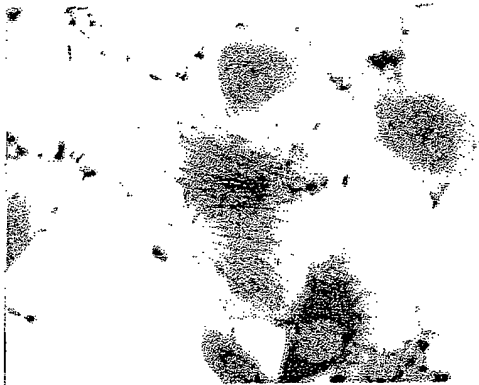


**Fig.4C**

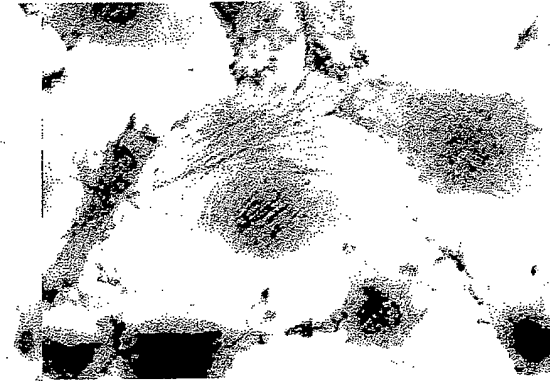


**Fig.4D**

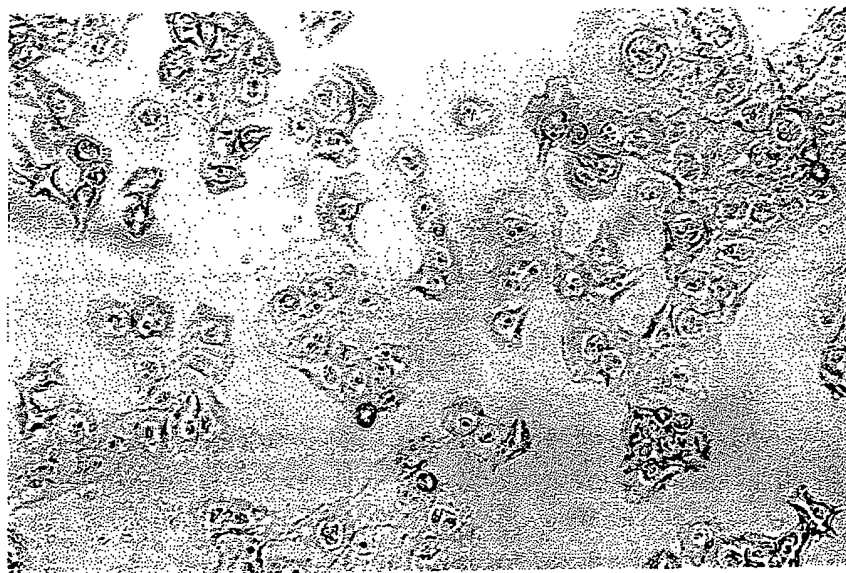


***Fig.5A***

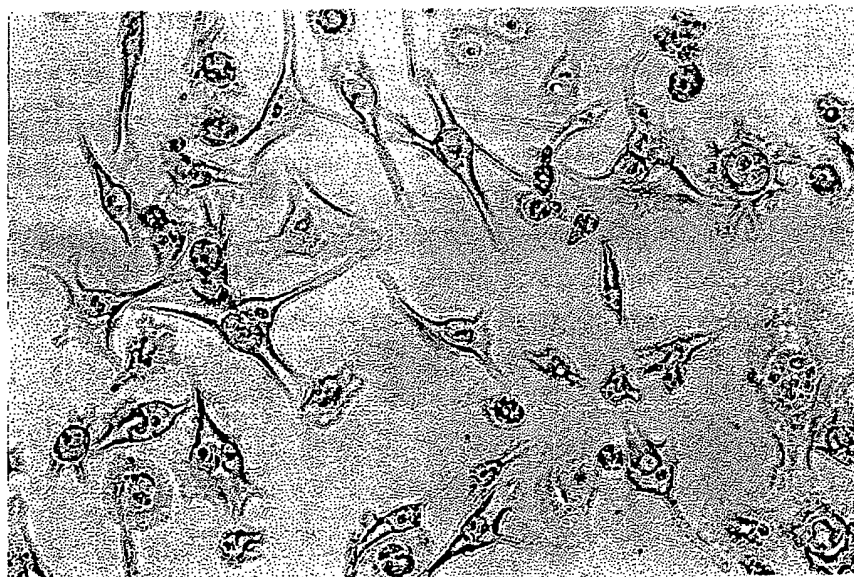


***Fig.5B***

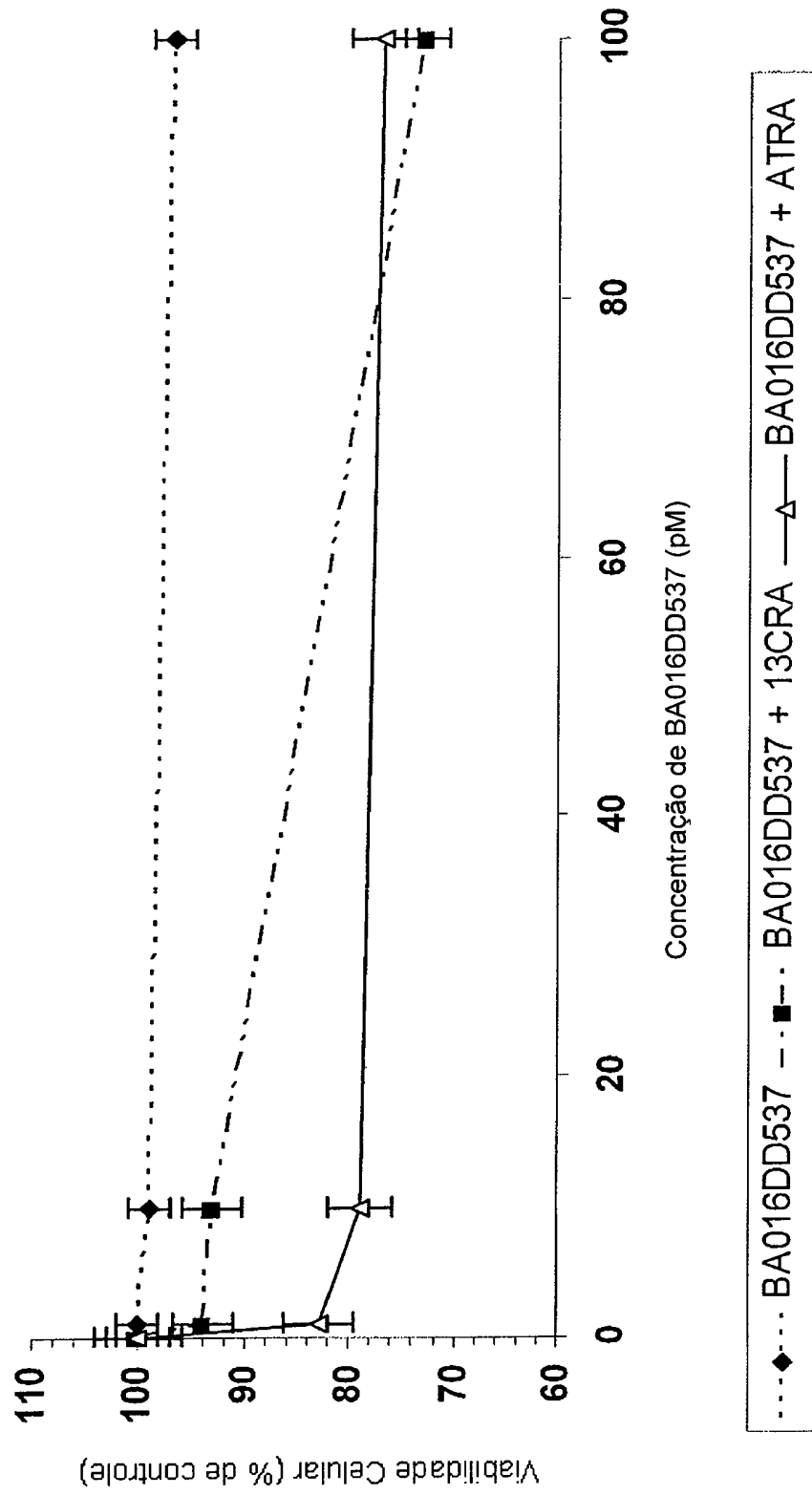


Fig.6

**RESUMO****“USO DE UM DERIVADO DE 9-HIDRÓXI ELIPTICINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, PRODUTO E DERIVADO DE 9-HIDRÓXI ELIPTICINA”**

A presente invenção refere-se ao uso de derivados de 9-hidróxi-  
5 elipticina para o tratamento de câncer. Derivados de 9-hidróxi-elipticina podem ser particularmente úteis para o tratamento de cânceres metastásicos ou cânceres que escapam de quimioterapias citotóxicas convencionais.