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

(21) **PI 0711280-7 A2**

BRPI0711280A2

(22) Data de Depósito: 03/05/2007
(43) Data da Publicação: 06/03/2012
(RPI 2148)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/132
C07C 11/09
A61P 13/08

(54) Título: MÉTODOS DE REPRODUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR PROFILATICAMENTE CÂNCER DA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE INIBIR ACETIL POLIAMINA OXIDASE NA PRÓTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EMN TECIDO HUMANO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM CACHORRO, DE REPRODUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO EM TECIDO HUMANO, DE USAR O KIT, E DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO DA PRÓSTATA DE SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ORAL, KIT E REAGENTES PARA MEDIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO EX VIVO OU IN VIVO EM UMA CÉLULA, ÓRGÃO, OU BIÓPSIA DE MAMÍFERO

(30) Prioridade Unionista: 03/05/2006 US 60/797142

(73) Titular(es): Wisconsin Alumni Research Foundation

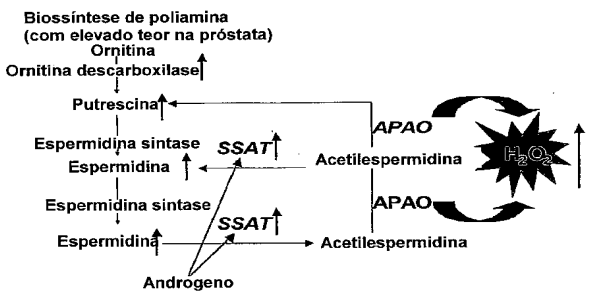
(72) Inventor(es): Dawn R. Church, George Wilding, Hirak S. Basu, Patrick M. Woster

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007010864 de 03/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/130589de 15/11/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE REDUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR PROFILATICAMENTE CÂNCER DA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE INIBIR ACETIL POLIAMINA OXIDASE NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO HUMANO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM CACHORRO, DE REDUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO EM TECIDO HUMANO, DE USAR O KIT, E DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO DA PRÓSTATA DE SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ORAL, E, KIT DE REAGENTES PARA MEDIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO EX VIVO OU IN VIVO EM UMA CÉLULA, ÓRGÃO, OU BIÓPSIA DE MAMÍFERO. Di-hidrocloreto de N1,N4-bis(buta- 1 ,3-dienil)butano-1,4-diamina (também referido como MDL 72.527 e di-hidrocloreto de N,N -di-2,3-butadienil-1,4-butanodiamina) ou sais ou solvatos dos mesmos, seu uso como um antioxidante, seu uso na prevenção e/ou tratamento de câncer da próstata em seres humanos do sexo masculino, e seu uso na redução da concentração de espécies de oxigênio reativo em tecido de glândula da próstata humana ou qualquer outro tecido do corpo, e métodos de fazer o composto para o mesmo. Outros métodos incluem inibir a acetil poliamina oxidase em tecido da próstata humana ou outro tecido do corpo humano compreendendo a administração de uma quantidade terapêutica de N,N1-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato do mesmo ao humano, e um método de determinar estresse oxidativo em tecido da próstata humana ou outro tecido do corpo humano ou animal compreendendo medir uma relação de fluorescência de diacetato de 2,7- dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA e fluorescência de corante de hidroetidina ex vivo ou in vivo.



"MÉTODOS DE REDUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR PROFILATICAMENTE CÂNCER DA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE INIBIR ACETIL POLIAMINA OXIDASE NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO HUMANO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM CACHORRO, DE REDUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO EM TECIDO HUMANO, DE USAR O KIT, E DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO DA PRÓSTATA DE SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ORAL, E, KIT DE REAGENTES PARA MEDIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO *EX VIVO* OU *IN VIVO* EM UMA CÉLULA, ÓRGÃO, OU BIÓPSIA DE MAMÍFERO"

DECLARAÇÃO REFERENTE A INTERESSE GOVERNAMENTAL

Esta invenção foi realizada com o apoio do governo dos Estados Unidos da América outorgado pelas seguintes agências: ARMY/MRMC DAMD17-02-1-0166 e NIH DK065303. O governo dos Estados Unidos da América tem determinados direitos nesta invenção.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade para o pedido de patente US número de série 60/797.142 depositado em 3 de maio de 2006, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Câncer da próstata metastático avançado refratário a hormônio é a segunda causa líder de mortes por câncer entre homens vivendo nos Estados Unidos. Foi determinado que, em 2006, acima de 27.000 homens

americanos irão morrer de câncer da próstata metastático. Atualmente, a maior parte dos agentes quimioterapêuticos usados em clínicas estão limitados ao tratamento da doença. Assim, existe uma necessidade substancial de novos agentes terapêuticos para tratar câncer da próstata metastático.

Por ocasião do diagnóstico inicial, a maior parte de pacientes com câncer da próstata tem tumores dependentes de androgênio que regridem rapidamente após cirurgia, radiação e terapia com ablação de androgênio. No entanto, o câncer reaparece poucos anos depois em uma porcentagem considerável destes pacientes. A recorrência aparece na forma da doença metastática avançada refratária a hormônio. Atualmente, não existe nenhuma terapia eficaz para tratar ou prevenir esta doença, particularmente em um estado avançado. Como tal, existe uma necessidade substancialmente urgente de desenvolver fármacos para reduzir a recorrência e progressão de câncer da próstata.

Foi formulada a teoria de que estresse oxidativo no tecido da próstata é um maior contribuinte para a progressão e ocorrência de câncer da próstata. Assim, existe ainda uma necessidade urgente de descobrir e desenvolver fármacos que reduzam terapeuticamente o estresse oxidativo.

Evidência epidemiológica e bioquímica publicada sugere que o estresse oxidativo no tecido da próstata é um dos maiores contribuintes para a progressão e ocorrência de câncer da próstata e que antioxidantes podem reduzir a carcinogênese da próstata. Sabe-se ainda que androgênio é um dos maiores indutores de ROS em células da próstata malignas e normais. (Ver Wilding, G., Endocrine Control of Prostate Cancer, Cancer Surveys, 23:43-62 (1995)). Sabe-se também que dentro da via catabólica de poliamina, a reciclagem da enzima acetil poliamina oxidase ("APAO") é uma fonte maior de produção de ROS. (Ver Cohen, S. S., A Guide to the Polyamines, Oxford Univ. Press, Oxford UK: 296-319 (1998); Schwartz, B et al, A New Model for Disruption of the Ornithine Decarboxylase Gene, SPEl, in Saccharomyces

Cerevisiae Exhibits Growth Arrest and Genetic Instability at the MAT Locus, Biochem J., Nov 15:312 (Pt. l):83-90 (1995); Schipper RG et al, Antitumor Activity of the Polyamine Analog $N(I)_5N(I\ l)$-diethyhiorspermine Against Human Prostate Carcinoma Cells, The Prostato, 44(4):313-21 (2000); Casero, RA et al, The Role of Polyamine Catabolism in Anti-tumour Drug Response, Biochem. Soc. Trans., Apr:31(2):361-5 (2003); Ha, HC et al, The Role of Polyamine Catabolism in Polyamine Analogue-Induced Programmed Cell Death, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(21):11557-62 (1997); e, Bey, P et al, N- 2,3-butadienil-1,4-butanodiamina Derivatives: Potent Irreversible Inactivators of Mammalian Polyamine Oxidase, J. Med. Chem, 28(l):l-2 (1985)).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um aspecto da invenção é um método de reduzir a concentração de espécies de oxigênio reativo na próstata de um ser humano do sexo masculino compreendendo as etapas ou ato de administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo.

Em uma forma de realização exemplar do método acima, a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para abaixar a concentração de uma ou mais espécies de oxigênio reativo na próstata em pelo menos 50% como comparado com as concentrações de espécies de oxigênio reativo em um ser humano do sexo masculino de controle não tratado.

Em uma forma de realização exemplar do método acima, o método ainda compreende a etapa ou ato de determinar uma reduzida concentração de espécies de oxigênio reativo por medida uma relação de fluorescência de hidroetidina oxidada: fluorescência de DNA *ex vivo*.

Em outra forma de realização exemplar do método acima, o método ainda compreende a etapa ou ato de determinar a reduzida

concentração de espécies de oxigênio reativo por medida *ex vivo* de uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'- dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA.

Em outra forma de realização exemplar do método acima, o método ainda compreende a etapa ou ato de determinar a concentração reduzida de espécies de oxigênio reativo por medida *ex vivo* uma relação de fluorescência de hidroetidina oxidada: fluorescência de DNA.

Em outra forma de realização exemplar de qualquer um dos métodos acima, as espécies de oxigênio reativo são uma ou mais dentre peróxido de hidrogênio, superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico, em que "superóxido" é uma molécula de oxigênio com um elétron extra. Por exemplo, uma molécula de superóxido pode ser um ROS formado no mitocôndrio celular.

Outro aspecto da invenção é um método de inibir acetil poliamina oxidase na próstata de um ser humano do sexo masculino compreendendo a etapa ou ato de administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato do mesmo ao humano, Em uma forma de realização exemplar, a acetil poliamida oxidase é inibida pelo menos 50% como comparado com um ser humano do sexo masculino não tratado.

Outro aspecto da invenção é um método de tratar profilaticamente câncer da próstata de um ser humano do sexo masculino compreendendo a etapa ou ato de administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo.

Em uma forma de realização exemplar do método acima, a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para prevenir ou reduzir a ocorrência e/ou recorrência de câncer da próstata como comparado com um ser humano do sexo masculino de controle não tratado com ou sem um câncer

da próstata previamente diagnosticado.

Outro aspecto da invenção é um método de tratar câncer na próstata de um ser humano do sexo masculino compreendendo a etapa ou ato de administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo.

Em uma forma de realização exemplar do método acima, a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para parar ou reduzir a progressão, morbidez e/ou mortalidade devido ao câncer da próstata.

Em uma forma de realização exemplar de qualquer um dos métodos acima, o sal é um acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, brometo, edetato de cálcio, cansilato, carbonato, cloreto, citrato, di-hidrocloreto, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glucosilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobrometo, hidrocloreto, hidroxinaftoato, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbrometo, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, mitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, ou trietiodeto.

Em outra forma de realização exemplar de qualquer um dos métodos acima, o sal é um sal de di-hidrocloreto.

Em outra forma de realização exemplar de qualquer um dos métodos acima, a quantidade terapêutica está na faixa de cerca de 1-100 mg/kg de peso corporal, e uma quantidade terapêutica é dosada na faixa de bi-semanalmente a diariamente.

Em outra forma de realização exemplar de qualquer um dos métodos acima, a quantidade terapêutica está na faixa de cerca de 10-40 mg/kg de peso corporal, e a quantidade terapêutica é dosada semanalmente.

Em outra forma de realização exemplar de qualquer um dos

métodos acima, a quantidade terapêutica está em torno de 25 mg/kg de peso corporal, e a quantidade terapêutica é dosada bi-semanalmente.

Outro aspecto da invenção é uma composição farmacêutica oral compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ingrediente farmacêutico ativo compreendendo N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo, e, um ou mais membros farmaceuticamente apropriados selecionados dentre o grupo consistindo de um veículo, excipiente, solvente, aditivo, veículo, estabilizador, diluente inerte, aglutinante, agente desintegrante e aglutinante.

Em uma forma de realização exemplar da composição farmacêutica oral, o sal é um acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, brometo, edetato de cálcio, cansilato, carbonato, cloreto, citrato, di-hidrocloreto, edetato, edissilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobrometo, hidrocloreto, hidroxinaftoato, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, brometo de metila, nitrato de metila, sulfato de metila, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato e trietiodeto.

Em uma forma de realização exemplar da composição farmacêutica oral, a composição está na forma de um comprimido não revestido, comprimido revestido, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina mole, pó, cápsula, grânulo, solução, suspensão, elixir ou emulsão.

Outro aspecto da invenção é um método de determinar o estresse oxidativo em tecido humano compreendendo a etapa ou ato de medir *ex vivo* uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'-dicloro- di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA.

Outro aspecto da invenção é um método de determinar estresse

oxidativo em tecido humano compreendendo a etapa ou ato de medir *ex vivo* uma relação de fluorescência de hidroetidina oxidada: fluorescência de DNA.

Outro aspecto da invenção é um método de determinar estresse oxidativo em tecido da próstata de ser humano do sexo masculino compreendendo a etapa ou ato de medir uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado:fluorescência de DNA *in vivo*.

Em uma forma de realização exemplar dos métodos acima, o tecido humano é tecido da próstata de ser humano do sexo masculino derivado de uma biópsia de tumor.

Em outra forma de realização exemplar dos métodos acima, o tecido humano é retirado de uma biópsia de tumor de uma parte do corpo diferente da próstata.

Outro aspecto da invenção é um método de tratar câncer na próstata de um cachorro compreendendo a etapa ou ato de administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo ao cachorro.

Outro aspecto da invenção é um método de reduzir a concentração de espécies de oxigênio reativo em tecido humano compreendendo a etapa ou ato de administrar a quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo ao humano.

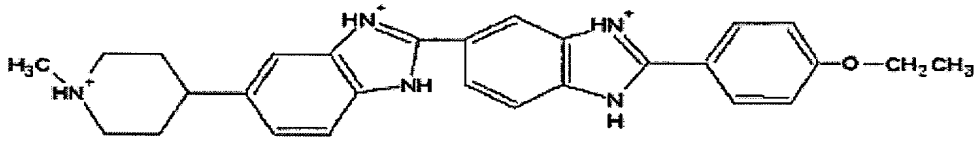
Em uma forma de realização exemplar do método acima, a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para abaixar a concentração de uma ou mais espécies de oxigênio reativo na próstata em pelo menos 50% como comparado com a concentração de espécies de oxigênio reativo em tecido humano não tratado.

Em uma forma de realização exemplar do método acima, as espécies de oxigênio reativo são um ou mais dentre peróxido de hidrogênio,

superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico.

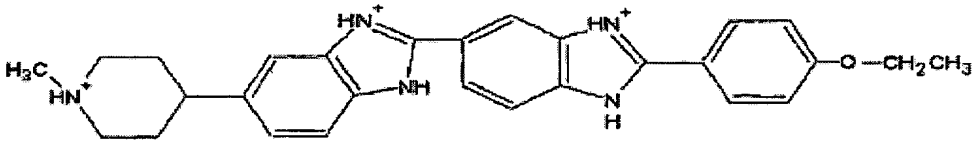
Outro aspecto da invenção é um kit de reagentes para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* ou *in vivo* em uma célula, órgão, ou biópsia de mamífero compreendendo um primeiro componente compreendendo um corante hidroetidina, e, um segundo componente compreendendo uma coloração de DNA de célula viva.

Em uma forma de realização exemplar do kit de reagentes acima, a coloração de DNA de célula viva compreende:



Outro aspecto da invenção é um método de usar o kit acima para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* em tecido derivado de células, órgãos ou biópsias de mamíferos compreendendo as etapas ou atos de colorir um primeiro tecido com o corante hidroetidina para produzir um primeiro número de unidades de fluorescência, colorir um segundo tecido com a coloração de DNA de célula viva para produzir um segundo número de unidades de fluorescência, e, normalizar o primeiro número de unidades de fluorescência para o segundo número de unidades de fluorescência para quantificar a concentração de espécies de oxigênio reativo.

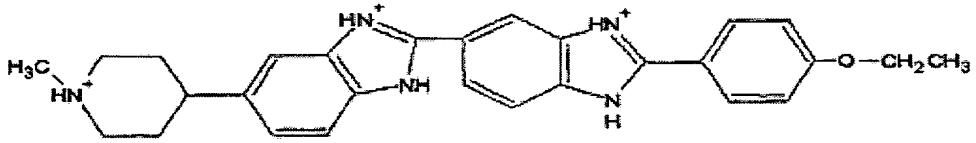
Em uma forma de realização exemplar do método acima, o DNA de célula viva compreende:



Outro aspecto da invenção é um kit de reagentes para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo ex vivo ou in vivo em uma célula de mamífero, órgão ou biópsia compreendendo um primeiro componente compreendendo um corante diacetato 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína, e, um segundo componente compreendendo uma coloração

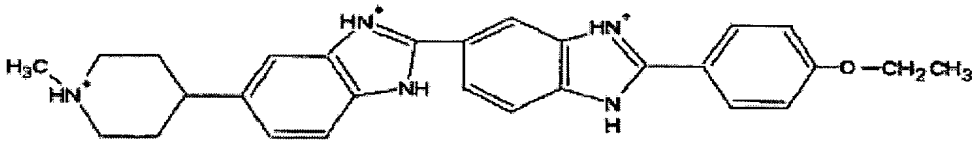
de DNA de célula viva.

Em uma forma de realização exemplar do kit de reagentes acima, o DNA de célula viva compreende:



Outro aspecto da invenção é um método de usar o kit de reagentes acima para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* em tecido derivado de células de mamífero, órgãos ou biópsias compreendendo as etapas ou atos de colorir um primeiro tecido com o corante diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína para produzir um primeiro número de unidades de fluorescência, colorir um segundo tecido com a coloração de DNA de célula viva para produzir um segundo número de unidades de fluorescência, e, normalizar o primeiro número de unidades de fluorescência no segundo número de unidades de fluorescência para quantificar a concentração de espécies de oxigênio reativo.

Em uma forma de realização exemplar do método acima, o DNA de célula viva compreende:



BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS EXEMPLARES

Figura 1 é uma ilustração esquemática do metabolismo de poliamina em termos da indução de SSAT induzida por androgênio em células da próstata causando a oxidação de poliamina e a produção de ROS.

Figura 2 é uma ilustração esquemática teórica do composto N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina da presente invenção agindo como um inibidor de acetil poliamina oxidase (APAO) e bloqueando a produção de ROS induzida por androgênio em células da próstata.

Figura 3 é uma ilustração em gráfico mostrando um gráfico da

quantificação de qRT-PCR do nível de mRNA de SSAT normalizado para níveis de mRNA de gliceraldeído-3-fosfo- dehidrogenase em células de câncer da próstata humano em LNCaP não tratadas e células tratadas com R1881 0,05 nM ou 1,0 nM durante 96 horas, em que os dados de QRT-PCR mostram que tratamento com Rl881 1 nM (um análogo de androgênio sintético) aumenta os níveis de mRNA de SSAT em células LNCaP.

Figura 4 é uma ilustração em gráfico mostrando um gráfico de fluorescência de DCF /fluorescência de DNA em células LNCaP em 72 horas de tratamento com a concentração do composto bisetil norspermina ("BE-3-3-3") não androgênico aumentando em células de câncer da próstata humana DU-145, em que os dados são normalizados para porcentagem de células não tratadas de controle, e em que BE-3-3-3 (um indutor conhecido de SSAT) aumenta o estresse oxidativo em células DU-145.

FIGURAS 5A-5E são ilustrações em gráficos mostrando gráficos dos níveis de putrescina (Pu), espermidina (Sd), espermina (Sm), N-acetil espermidina (N-Ac-Sd) e N-acetil espermina (N-Ac-Sm) em células da próstata humana LNCaP tratadas com 25 μg do composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina durante 120 horas, e, com e sem tratamento com Rl 881 1 nM durante 96 horas, e células pré-tratadas durante 24 horas com 25 μM do composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina seguido por tratamento com R1881 1 nM durante 96 horas, em que os níveis de poliamina são expressados em nmoles/10^6 células e foram determinados usando o método de HPLC (ver Kabra, PM et al, Solid-Phase Extraction and Determination of Dansyl Derivatives of Unconjugated and Acetylated Polyamines by Reverse-Phase Liquid Chromatography: Improved Separation Systems for Polyamines in Cerebrospinal Fluid, Urine and Tissue, J. Chromatogr., 1986;380(l):19-32) usando padrões comercialmente disponíveis, e em que os dados mostram os níveis de poliamina e acetil poliamina em células LNCaP tratadas com Rl 881 1 nM ± 25 μM de MDL 72.527.

Figura 6 é uma ilustração em gráfico mostrando um gráfico de fluorescência de DCF /fluorescência de DNA em células LNCaP expressadas como uma porcentagem de células não tratadas de controle tratadas com concentração de R1881 crescente, em que os dados mostram que um pré-tratamento com MDL 72.527 bloqueia eficazmente a produção de ROS induzida por androgênio em células LNCaP.

FIGURAS 7A-7D incluem fotografias de seções da próstata de camundongos TRAMPxFVB F1 de 20 semanas de idade (Hybrid Mouse Prostatic Lumens) injetados com 8 mg/kg de peso corporal de hidroetidina (HEt) i.v. uma hora antes do sacrifício (em que TRAMP é o adenocarcinoma transgênico do modelo de próstata de camundongo), em que a Figura 7A mostra uma fotografia microscópica de contraste de fase representativa da seção da próstata de animais tratados com veículo somente, em que a Figura 7B mostra uma fotografia microscópica de fluorescência da seção da próstata mostrada na Figura 7A, em que a Figura 7C mostra uma fotografia microscópica de contraste de fase representativa da seção da próstata de animais sacrificados 2 semanas após tratamento com 6 administrações de 25 mg/kg de peso corporal do composto N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina, em que a Figura 7D mostra uma fotografia microscópica de fluorescência de Het da seção da próstata mostrada na Figura 7C, em que todas as fotografias foram tomadas em ampliação de 20x usando um microscópio de fluorescência BH-2 Olympus™ usando filtros de excitação a 480 nm/ emissão a 600 nm acoplados com uma câmera digital Sony DSC-V3 ajustada em F2.8 e 30 s, em que as fotografias ilustram uma redução em estresse oxidativo devido à administração do fármaco, e em que uma menor fluorescência de Het indica menor estresse oxidativo em camundongos tratados com MDL 72.527

Figura 8 é uma ilustração em gráfico de um gráfico da % de sobrevivência dos animais versus idade de camundongos do sexo masculino

TRAMP, em que os animais foram tratados com 2,5 mg/kg de peso corporal do composto N,N'- bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou controle de veículo de solução salina i.p. em um regime bi-semanal (nas semanas marcadas "tx") e seguido por sobrevivência, em que a sobrevivência foi determinada pelo tempo até a eutanização devido à carga do tumor, e em que os dados mostram uma melhora na sobrevivência global tratando com MDL 72.527, em camundongos TRAMP.

Figura 9 é uma ilustração em gráfico de um gráfico do peso corporal do animal (g) versus idade do animal (semanas) para camundongos TRAMPxFVB tratados com 25 mg/kg de peso corporal de MDL 72.527 ou veículo de solução salina e um controle em um regime bi-semanal (nas semanas marcadas "tx"), em que os dados demonstram que o MDL 72.527 não tem nenhum efeito tóxico material como determinado por mudanças no peso corporal de camundongos TRAMPxFVB.

Figura 10 é uma ilustração em gráfico de um gráfico da percentagem de animais com tumor palpável distinto versus idade do animal (semanas), em que camundongos TRAMPxFVB foram tratados com 25 mg/kg de peso corporal do composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina de duas em duas semanas (em "tx"), e em que os dados demonstram que o tratamento com MDL 72.527 retarda o tempo de desenvolvimento de tumor em camundongos TRAMPxFVB.

Figura 11 é uma ilustração em gráfico de um gráfico da % de sobrevivência dos animais versus idade (semanas) de camundongos TRAMPxFVB do sexo masculino, em que os animais foram tratados com 25 mg/kg de peso corporal do composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou controle de veículo i.p. em um regime bi-semanal (nas semanas marcadas "tx") e seguido por sobrevivência, em que a sobrevivência foi determinada pelo tempo em eutanização devido à carga do tumor, e em que os dados mostram uma melhora na sobrevivência global por tratamento

com MDL 72.527 em camundongos TRAMPxFVB.

Figura 12 é uma análise *Western blot* mostrando que a administração do composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina induzindo o bloqueio do efeito de androgênio em camundongos TRAMPxFVB não foi devido à regulação negativa do receptor de androgênio ("AR").

Figura 13 mostra um gráfico de fluorescência de DCF/ fluorescência de DNA representando níveis de ROS em clones de células LNCaP transfectadas com vetor sozinho ou com vetor expressando siRNA contra SSAT (si22), em que as células foram não tratadas ou tratadas com R1881 1 nM durante 96 horas, em que todos os dados foram normalizados com os de células não tratadas transfectadas com vetor sozinho, em que o R1881 1 nM que induziu a produção de ROS foi notavelmente reduzido em células de clones LNCaP silenciadas com SSAT (si22), e em que os dados mostram que a oxidação de poliamina é a fonte de ROS em PCa.

FIGURAS 14 e 15 mostram gráficos de sobrevivência de Kaplan-Meier da porcentagem de sobrevivência versus idade de TRAMP na Figura 14 e camundongos TRAMPxFVB do sexo masculino na Figura 15, em que os animais foram tratados tanto com 25 mg/kg de peso corporal de MDL 72.527 como com controle de veículo de solução salina por injeção intraperitoneal bi-semanalmente, nas semanas marcadas por setas, e seguido por sobrevivência, em que a sobrevivência foi determinada pelo tempo de eutanização devido à carga do tumor, em que (como mostrado na Figura 14) MDL 72.527, que foi administrado uma vez em duas semanas x3 tratamento melhorou a sobrevivência global de animais TRAMP, e em que (como mostrado na Figura 15) MDL 72.527, que foi administrado uma vez em 2 semanas x6 de tratamento melhorou a sobrevivência global de camundongos TRAMPxFVB.

Figura 16 mostra um gráfico de animais de vinte semanas de

idade com tumor palpável antes de 8 dos animais serem sacrificados por determinação microscópica da existência de neoplasma intraepitelial prostático (PIN) ou carcinoma no tecido da próstata por exame patológico, em que o tempo para desenvolvimento do tumor em TRAMPxFVB tratados com MDL 72.527 a 25 mg/kg de peso corporal uma vez de duas em duas semanas é mostrado.

Figura 17 mostra uma fotografia de tecido do lúmen prostático humano removido cirurgicamente de homens não tratados em lâmina de 4-5 mm de espessura e incubado em solução de HEt (8 mg/ml) durante 60 min, a 37°C, antes do processamento do tecido (bloqueio com parafina e seccionamento do micrótomo para micrografia de fluorescência), em que as fotografias foram tomadas em ampliação 20x, em comprimento de onda de excitação em 480 nm/ emissão em 595 nm, após tratamento incluindo o mesmo.

Figura 18 mostra uma fotografia da mesma seção do lúmen de próstata humana usado na Figura 17, em que a coloração de HEt mostra uma diferença entre as células epiteliais e as células estromais, e em que os dados confirmam alto estresse oxidativo somente nas células epiteliais prostáticas.

Figura 19 mostra o presente método de produzir N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina.

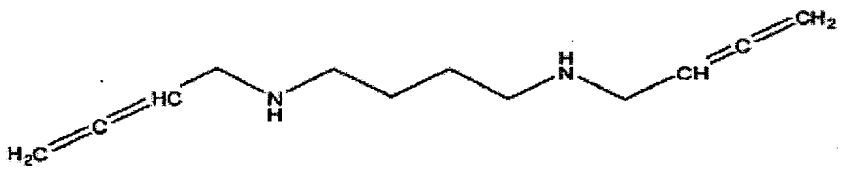
DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A invenção refere-se a di-hidrocloreto de N1,N4-bis(buta-1,3-dienil)butano-1,4- diamina (também referido como MDL 72.527 e di-hidrocloreto de N,N'-di-2,3-butadienil-1,4-butanodiamina), ou sais ou solvatos dos mesmos, seu uso como um antioxidante, seu uso na prevenção e/ou tratamento de câncer da próstata em humanos do sexo masculino, e seu uso na redução da concentração de espécies de oxigênio reativo no tecido da glândula da próstata humana, e métodos para produzir o composto a partir dos

mesmos. Outros métodos incluem a inibição de acetil poliamina oxidase no tecido da próstata humana ou outro tecido do corpo humano compreendendo administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato do mesmo ao humano, e método de determinar estresse oxidativo no tecido da próstata humana ou outro tecido do corpo humano ou de animal compreendendo medir uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA e fluorescência do corante hidroetidina *ex vivo* ou *in vivo*. A invenção pode ser usada *ex vivo* ou *in vivo* em qualquer mamífero como um humano ou um cachorro.

A presente invenção inclui agentes quimioterapêuticos que especificamente reduzem estresse oxidativo em tecido da próstata, desse modo prevenindo e/ou tratando a progressão de câncer da próstata, particularmente em pacientes de alto risco. É estabelecido que espécies de oxigênio reativo ("ROS") são produzidas na glândula da próstata em níveis relativamente altos como comparado a outros órgãos. ROS incluem, mas não estão limitadas a, peróxido de hidrogênio, superóxido, radical hidroxila e ácido nítrico.

Sem estar limitado por qualquer teoria, foi formulada a teoria de que a administração do presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina inibe os processos de acetil poliamina oxidase ("APAO") e poliamina oxidase (PAO) especificamente bloqueando a via bioquímica para estresse oxidativo induzido por androgênio (isto é, produção de ROS) e deste modo marcando terapia antioxidante para tecido da glândula da próstata. É ainda formulada a teoria de que a administração do presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)- 1,4-butanodiamina não tem nenhum efeito material adverso na via de sinalização de androgênio A estrutura de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina é mostrada abaixo.



Preferivelmente, uma forma livre, sal ou solvato de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina é administrado a um mamífero humano ou não humano. A forma de sal ou solvato pode ser qualquer sal ou solvato farmaceuticamente aceitável. Preferivelmente, a forma de sal farmaceuticamente apropriada é N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina•2HCl. Preferivelmente, a forma de solvato farmaceuticamente apropriada é N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina •2HC1 dissolvido em um solvente farmaceuticamente apropriado, como um solvente polar, preferivelmente água.

Como tal, a administração do presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina retardou com sucesso o desenvolvimento de tumor de próstata e aumentou a taxa de sobrevivência global no adenocarcinoma transgênico pré-clínico, bem aceito, de modelo de próstata de camundongo ("TRAMP"). (Ver, por exemplo, Garcia, GE et al, 2-Methoxyestradiol Inhibits Prostate Tumor Development in Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate: Role of Tumor Necrosis Factor-Simulated Gene 6, Clin Cancer Res 12(3) (Fev. 2006). O modelo TRAMP desenvolve espontaneamente câncer da próstata e morre da doença. A administração do presente composto N_5N'- bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina reduziu notavelmente estresse oxidativo em uma linhagem de células de tumor dependente de androgênio, cultivada, e em lesões pré-neoplásicas no animal TRAMP *in vivo*. O presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina também pode ser administrado como uma terapia adjuvante para prevenir recaídas em pacientes anteriormente tratados para tumor de próstata primário.

Foi relatado que ROS são produzidos na glândula da próstata

em níveis mais altos do que em outros órgãos. ROS alteram os genes relacionados a crescimento ou apoptose tanto por efeitos mutagênicos diretos sobre o DNA como por alterações na expressão do gene. Altos níveis de ROS no tecido da próstata podem desempenhar um papel maior em ambos início e progressão de câncer da próstata. ROS podem causar peroxidação de lipídeos, alterar a atividade de enzimas dependentes de tiol ou danificar DNA.

Baixos níveis de ROS atuam como mitogenes induzindo alterações do tumor ou redox devido à produção de ROS desempenhar um papel chave nas vias de transdução de sinal específicas. Dietas com alto teor de gordura aumentam a peroxidação de lipídeos (desse modo produzindo ROS) que causa uma incidência relativamente mais alta de câncer da próstata em nações industrializadas quando comparado a países em desenvolvimento. Os dados publicados suportam um decréscimo na incidência de câncer da próstata onde a dieta inclui antioxidantes dietéticos como β-caroteno, β-licopeno, vitamina E e selênio, que reduzem os níveis de ROS celulares.

Recentemente, evidência experimental e clínica liga estresse oxidativo aumentado com desenvolvimento aumentado de tumores de próstata. Imuno-histoquímica é usada para medir dano oxidativo induzido por estresse oxidativo nas bases de DNA em blocos de parafinas de arquivo de tecidos de próstata humana normais e malignos removidos cirurgicamente. Tecidos de tumor de próstata humana malignos e metastáticos mostram modificações de bases de DNA e de proteína induzidas por ROS mais altas do que tecido de próstata normal. Imuno-histoquímica mostra também que dano oxidativo a DNA e proteína é significativamente mais alto nas lesões pré-neoplásicas na próstata de TRAMP quando comparado a tecido de próstata normal adjacente.

Androgênio foi identificado como um agente natural que induz estresse oxidativo no tecido da próstata. Corante hidroetidina fluoresce quando de oxidação por ROS. A presença de alto estresse oxidativo em

xenoenxertos de tumor humano LNCaP é observada em camundongo nu do sexo masculino *in vivo*. O nível aumentado de estresse oxidativo em camundongo carregando tumor foi reduzido em 72 horas após castração cirúrgica removendo a fonte de ocorrência natural de androgênio.

Os mecanismos moleculares exatos relativos à produção de ROS induzida por androgênio no tecido da próstata são desconhecidos. Outras vias levando à produção de ROS aumentada em células CaP são descritas como: Expressão de fatores de transcrição nucleares (como fator de transcrição induzido por hipoxia ("HIF-lα"), NF-κB, AP-I, etc.); e, supressão da expressão de glutationa S-transferese levando a níveis reduzidos de glutationa total, um agente de redução. As vias sugeridas não podem ser mutuamente exclusivas.

Espermidina e espermina são poliaminas em que a putrescina diamina precursora é um cátion orgânico presente em todas as células de mamífero. Estas poliaminas são essenciais para a proliferação e cultura de células. O sêmen de homens saudáveis contém grandes quantidades de espermina (~ 3 mM) produzidas primeiramente durante secreção prostática.

Como mostrado na figura 1, o catabolismo de poliamina é conduzido por um processo de espermidina/ espermina N-acetiltransferase ("SSAT") que produz N-acetil poliaminas. N-acetil poliaminas são oxidadas pela enzima constitutiva APAO. APAO usa FAD que é reduzido para $FADH_2$ durante oxidação das acetil poliaminas. $FADH_2$ é retro reciclado para FAD regenerando a enzima APAO ativa através da produção de H_2O_2 (isto é, um ROS). A expressão melhorada de enzimas catabólicas de poliamina (através da indução de fatores de transcrição específicos e diminuição de glutationa celular total) pode melhorar o estresse oxidativo celular devido ao catabolismo de poliamina.

Como mostrado na figura 1, SSAT é a enzima limitando a taxa da via catabólica de poliamina. Acetil poliaminas produzidas por SSAT

funcionam como substratos para oxidação de APAO e produção de ROS concomitante. Dados de microarranjo de DNA e qRT- PCR recentes sugerem que androgênio induz 30-50 vezes a super-expressão do gene SSAT em células de câncer da próstata humana LNCaP dependentes de androgênio.

É bem aceito na arte que androgênio, em concentrações fisiológicas, induz a produção de ROS em células de câncer da próstata dependentes de androgênio. Um teste de oxidação de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína (DCF) foi usado para medir a relação de: DCF oxidado: fluorescência de DNA que é uma medida bem aceita de níveis de ROS em linhagens de células da próstata. Os dados e resultados são mostrados na tabela 1.

Tabela 1

ROS em células de próstata por teste de oxidação de DCFH

Linhagem de célula	Meio	Tratamento	Unidades: Fluor. de DCF/DNA	Desvio padrão
Células epiteliais prostáticas imortalizadas	de Ham F12+F(5)	Nenhum	0,09	± 0,02
DU-145	DMEM+F(5)	Nenhum	0,33	± 0,03
DU-145	DMEM+F(5)	1 μM BE-3-3-3	0,67	± 0,07
DU-145	DMEM+F(5)	1 μM BE-3-3-3+25 μM MDL 72.527	0,26	± 0,02
LNCaP	DMEM+F(5)	Nenhum	0,99	± 0,03
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	Nenhum	1,20	± 0,02
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	R1881 1 nM	3,34	± 0,05
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	R1881 1 nM + 15 μM Vitamina E	1,80	± 0,04
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	1 μM BE-3-3-3	3,19	± 0,04
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	1 μM BE-3-3-3+25 μM MDL 72.527	1,87	± 0,04

F(5) = 5% de soro bovino fetal

F1/C4 = 1% de soro bovino fetal + 4% de soro extraído de carvão (depletado com androgênio)

As células de câncer da próstata humana LNCaP foram cultivadas em um meio depletado com androgênio de 1% de FBS e 4% de

FBS extraído de carvão, (F1/C4) e na presença ou ausência de análogo de androgênio sintético R 1881 1 nM com ou sem pré-tratamento com 15 μM de antioxidante α-tocoferol (vitamina E). Os níveis de ROS das células de câncer da próstata humana LNCaP e DU-145 são mostrados como sendo tratadas com BE-3-3-3, que é um agente de indução de SSAT conhecido, como ou sem tratamento com 25 μM com MDL 72.527.

Os dados na tabela 1 sugerem que os níveis de ROS em todas as linhagens de células de câncer da próstata são relativamente mais altos do que os níveis observados em células epiteliais prostáticas normais. Os dados na tabela 1 também sugerem que células LNCaP têm relativamente mais ROS do que células DU-145; que o análogo de androgênio R1881 na concentração de 1 nM, que é comparável a níveis fisiológicos de androgênio, melhora o nível de ROS em células LNCaP; que uma dose subletal de BE-3-3-3 (1 μM) melhora os níveis de ROS em ambas as linhagens de células; e que a melhora nos níveis de ROS é revertida/ reduzida/ prevenida por pré-tratamento com vitamina E e/ou MDL 72.527.

Como mostrado esquematicamente na figura 1, níveis de poliamina extraordinariamente altos em células da próstata e a alta indução de SSAT podem induzir grandes aumentos nos níveis de ROS. Uma análise de microarranjo de DNA da expressão de genes em células LNCaP não tratadas de controle e células tratadas com análogo de androgênio R1881 1 nM durante 96 horas foi realizada duas vezes usando Affymetrix Genechip Arrays. Em ambas as experiências, SSAT foi claramente identificado como sendo altamente super-expressado em R1881 tratado com células LNCaP quando comparado a células de controle não tratadas. Dentre a lista de genes que são super-expressados (mais do que 10 vezes acima do controle), SSAT foi a única enzima conectada à via de geração de ROS.

Dados gerados usando o microarranjo de DNA e qRT-PCR são mostrados na figura 3. Cada ponto de dados é uma média de leituras de

quantidade seis cavidades tratadas identicamente repetidas duas vezes em triplicatas. Os dados de qRT-PCR mostram um aumento de 50 vezes na expressão do gene SSAT de R1881 tratado com células LNCaP quando comparado às células de controle não tratadas. Nota-se ainda que SSAT foi super-expressado somente em células tratadas com R1881 1 nM (que induz estresse oxidativo) mas não em células tratadas com R1881 0,05 nM onde nenhum aumento em estresse oxidativo foi observado. Pode ser ainda postulado que a expressão de gene SSAT induzida por androgênio é um contribuinte significativo para a produção de ROS celular em células de câncer da próstata dependentes de androgênio.

A figura 4 mostra o papel de SSAT na produção de ROS celular usando bisetinorspermina (BE-3-3-3). Sabe-se que BE-3-3-3 induz a atividade da enzima SSAT em várias linhagens de células incluindo células de câncer da próstata LNCaP dependentes de androgênio e DU-145 independentes de androgênio. Células DU-145 foram tratadas com concentrações aumentadas de BE-3-3-3 durante 72 horas. O estresse oxidativo foi medido usando placa de 96 cavidades baseado em teste oxidativo de corante diacetato de 2'7'-diclorfluoresceína ("DCF"). Cada ponto de dados é uma média de quantidade de 6 cavidades tratadas identicamente foram repetida duas vezes em triplicatas. Os dados demonstram que BE-3-3-3 (em uma dose não citotóxica, <1 μM) aumenta a oxidação de poliamina e aumenta os níveis de ROS celulares, e que a oxidação de poliamina é um fator significativo para produzir estresse oxidativo em células prostáticas.

As figuras 5A-5E mostram o efeito de pré-tratar células LNCaP (com e sem serem tratadas com R1881) com o presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4- butanodiamina sobre os níveis de poliamina e acetil poliamina. O método de HPLC de quantificação foi usado para quantificar níveis de poliamina e acetil poliamina em células LNCaP tratadas com R1881 1 nM ± 25 μM de MDL 72.527. Cada ponto de dados é uma

média de 2 determinações de pelotas de células coletadas de quantidade de 3 experiências independentes. As figuras 5A-5E mostram que tratamento com R1881 (em uma concentração de 1 nM durante 96 horas) aumenta significativamente os níveis de putrescina e espermidina, diminui o nível de espermina, e, aumenta os níveis de N-acetil espermidina e N-acetil espermina.

Pode ser declarado que as figuras 5A-5E sustentam a conclusão de que o tratamento com R1881 aumenta os níveis de mRNA em SSAT enquanto melhorando a atividade da enzima SSAT. Em células R1881, pré-tratamento com o presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina bloqueou quase completamente o aumento induzido nos níveis de putrescina e espermidina (atribuível ao R1881 1 nM), e causou aumento significativo nos níveis de N-acetil-espermidina e N-acetil-espermina sem trocar apreciavelmente o nível de espermina. Um aumento insignificativamente pequeno no nível de N-Ac-espermina em células tratadas com o presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina foi observado. Foi também observado que células tratadas com MDL 72.527 a 25 μM bloquearam eficientemente e eficazmente a atividade de APAO. O grande aumento observado nos níveis de acetil poliamina também sugere que a administração de MDL 72.527 não tem nenhum efeito material sobre a expressão do gene SSAT e/ou atividade enzimática em células tratadas com androgênio.

São mostrados na figura 6 os dados demonstrando que a administração de pré-tratamento de 25 μM de MDL 72.527 bloqueia eficazmente a produção de ROS induzida por androgênio em células LNCaP. Os níveis de ROS em células LNCaP foram induzidos aumentando a concentração de R1881 durante 96 horas com e sem o pré-tratamento com MDL 72.527. Os resultados foram determinados usando métodos de teste de oxidação de DCF. Cada ponto de dados é uma média de leitura da quantidade de 6 cavidades repetidas duas vezes em triplicatas. Os dados relativos aos

níveis de ROS de células pré-tratadas com o composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina foram normalizados em relação aos efeitos da administração de MDL 72.527 sozinho. Os dados na figura 6 sugerem que pré-tratamento usando MDL 72.527 ($\geq$ 1 nM) bloqueia eficazmente a produção de ROS induzida por R1881. Os dados também sugerem que a inibição de poliamina oxidase usando MDL 72.527 reduz significativamente os níveis de ROS celulares em células de câncer da próstata dependentes de androgênio, e que MDL 72.527 é um antioxidante efetivo que bloqueia especificamente a produção de ROS induzida por androgênio em células de câncer da próstata humana dependentes de androgênio.

As figuras 7A-7D mostram que a administração do composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina reduz estresse oxidativo no tecido da próstata em animais TRAMPxFVB *in vivo*. Um método usando oxidação de corante hidroetidina (HEt) foi padronizado para observar o estresse oxidativo em tumores da próstata *in vivo*. HEt oxida em 2- hidróxi etídio especificamente por um ROS(41). O 2-hidróxi etídio fluoresce em freqüências de excitação em 488 nm e emissão em 595 nm. O corante HEt pode ser injetado seguramente em animais pelo menos 1 hora antes do sacrifício. Animais TRAMPxFVB de vinte semanas de idade foram injetados com HEt (8 mg/kg de peso corporal) 1 hora antes do sacrifício. Após o sacrifício, as glândulas da próstata foram coletadas, fixadas com formalina e embutidas em parafina. Blocos de parafina foram seccionados no micrótomo, e os tecidos foram desparafinizados, observados usando microscopia de fluorescência, e analisados usando análise de imagem digital. As imagens são mostradas nas figuras 7A-7D).

A figura 7A mostra uma fotografia microscópica de contraste de fase de uma seção da próstata de animais tratados com veículo somente. A figura 7B mostra fotografia microscópica de fluorescência da seção da próstata mostrada na figura 7 A. A figura 7C mostra a fotografia microscópica

de contraste de fase da seção da próstata de animais sacrificados 2 semanas após tratamento com 6 administrações de 25 mg/kg de peso corporal de MDL 72.527. a figura 7D mostra uma fotografia microscopia de fluorescência de HEt da seção da próstata mostrada na figura 7C. A fotografia mostrada nas figuras 7A-7D foram tomadas em ampliação 20x usando um microscópio de fluorescência Olympus BH-2 usando filtros de excitação em 480 nm/ emissão em 600 nm acoplados com uma câmera digital Sony DSC-V3 ajustada em F2.8 e exposição de 30 s.

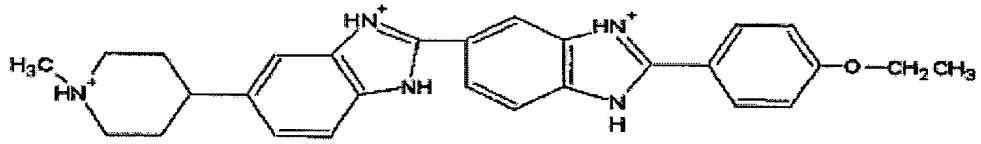
Fluorescência elevada (devido à oxidação de HEt) foi geralmente observada no lúmen prostático, particularmente nas bordas de células invasoras, que começam formando neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Em contraste, nenhuma oxidação de corante foi detectada nos tecidos de camundongos TRAMP prostáticos tratados com MDL 72.527 (ver figura 7D), como confirmado pela coloração de H&E subseqüente. Os dados mostrados nas figuras 7A-7D sugerem que o composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina inibe significativamente estresse oxidativo *in vivo* no lúmen prostático de camundongos TRAMP que começam formando PIN, que ainda sugere que a oxidação de poliamina é um contribuinte significativo para estresse oxidativo em células da próstata humana cultivadas e o lúmen prostático de animais TRAMP *in vivo*.

Teste oxidativo de DCFH. As culturas de 96 cavidades ou tecidos de animal ou humano re-seccionados recentemente foram testadas para estimativa de níveis de ROS em células intactas usando o corante diacetato de 2',7' -diclorfluoresceína (DCF) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Os tecidos re-seccionados ou culturas de células foram lavados com 200 μL de tampão de Kreb Ringer (NaCl 116 mM, KCl 4,2 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, NaH_2PO_4 1,6 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, $NaHCO_3$ 22 mM e D-glicose 11 mM), pré-aquecidos a 37°C, incubados a 37°C em 100 μL de tampão de Krebs Ringer contendo 10 μg/mL (concentração final) de corante DCF durante 45

minutos. Cada placa de 96 cavidades foi escaneada em um escaner de placa CytoFluor 2350™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando freqüências de excitação em 485/ emissão em 530. Cada amostra de tecido foi escaneada.

Ensaio de hidroetidina. Corante hidroetidina foi dissolvido em DMSO (100 mg/ml) e diluído em solução salina isotônica em 1 mg/ml antes da injeção. O corante foi tanto injetado i.v. em camundongos através da veia da cauda 1 hora antes do sacrifício (*in vivo*) como os tecidos humano e de animal re-seccionados recentemente foram lavados em PBS isotônico e embebidos em 8 mg/ml de solução de corante em tampão de Kreb Ringer pré-aquecido a 37°C durante 60 minutos a 37°C (*ex vivo*) antes do processamento. Durante os teste s *in vivo*, os animais foram submetidos à eutanásia e sangrados antes da coleta do tumor e outros tecidos. Os tecidos após tratamento foram embutidos em blocos de parafina. As seções de micrótomo dos blocos foram montadas em lâminas e foram quantificadas para fluorescência em freqüências de excitação em 488 nm/ emissão em 595 nm.

Ensaio de DNA. Cinqüenta µL de tampão de Kreb Ringer (40 µg/mL) contendo corante Hoechst 33342, que contém



foram adicionados a cada cavidade 45 minutos e em todos os tecidos 60 minutos antes das medições de fluorescência. A fluorescência de DNA foi determinada excitação em 360 nm/ emissão em 460 nm. Toda a fluorescência de DCF ou hidroetidina foi normalizada para fluorescência de DNA para quantificação apropriada do estresse oxidativo.

BD Bioimager: Todas as leituras de fluorescência foram quantificadas usando BD Pathway Bioimager automático, confocal, em tempo real, cinética de célula única e sistema de formação de imagem de ponto final (BD Biosciences (Laguna Hills, CA).

Os dados mostrados na figura 8 sugerem que a administração

do composto N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina aumenta a taxa de sobrevivência global ("OS") de camundongos TRAMP. Camundongos TRAMP que formam espontaneamente tumores de próstata em 20-22 semanas de idade e a maior parte morre devido à carga do tumor em 30-32 semanas de idade foram testados. Camundongos TRAMPxFVB que iniciam formando tumores de próstata em 12-14 semanas de idade e a maior parte morre devido à carga do tumor em 20-22 semanas de idade também foram testados (dados mostrados nas figuras 9-11). Como mostrado na figura 9, uma dose de 25 mg/kg de peso corporal de MDL 72.527 foi usada, a qual foi bem tolerada (isto é, nenhum sinal aberto de toxicidade, comportamento anormal ou perda de peso corporal foi observado). Uma dose acima de 20 mg/kg de peso corporal foi requerida para inibir completamente acetil poliamina oxidase em camundongos.

No estudo com animal TRAMP, o composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4- butanodiamina foi administrado em 22 semanas, em que alguns dos animais iniciaram mostrando tumores palpáveis. Os animais (quantidade de 5 em cada grupo) foram injetados 3 vezes com 25 mg/kg de peso corporal de MDL 72.527 i.p. em um regime bi-semanal. OS é mostrado na figura 8, que sugere melhora significativa comparado a animais tratados com o veículo.

No estudo usando os camundongos TRAMPxFVB, quantidade de 8 animais estavam no grupo tratado com MDL 72.527, e quantidade de 8 camundongos estavam no grupo tratado com veículo. Uma vez que estes animais iniciam o desenvolvimento de tumor da próstata em uma idade anterior do que os animais TRAMP, o tratamento começa em 8 semanas de idade., O tratamento incluiu quantidade de 6 injeções de MDL 72.527 a 25 mg/kg de peso corporal i.p. em um programa de regime de administração bi-semanal. Os resultados são mostrados na figura 11, que sugere um aumento significativo em OS para os animais tratados com MDL 72.527 quando

comparado ao controle veículo. Acima de 60% dos camundongos TRAMPxFVB tratados com MDL 72.527 sobreviveram pelo menos 8 semanas após o término da terapia, e pelo menos 6 semanas após a morte do grupo total de animai tratados com veículo de controle. Os dados nas figuras 8 e 9 mostram que cepas diferentes de animais TRAMP reproduzíveis mostram acima de 60% de benefício de sobrevivência para animais tratados com MDL 72.527 quando comparado aos camundongos tratados com veículo.

Os dados na figura 10 sugerem que a administração do composto N,N'- bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina retarda o tempo de desenvolvimento de tumor em camundongos TRAMPxFVB. Os sinais de tumor de próstata palpável foram monitorados duas vezes por semana. Em 11 semanas (animais com 22 semanas de idade) após tratamento com MDL 72.527 (a 25 mg/kg de peso corporal, administrados uma vez bi-semanalmente) foi descontinuado, mais de 40% dos camundongos tratados não demonstrou nenhum sinal de tumor palpável na próstata ou em qualquer outra parte do corpo.

Os dados mostrados nas figuras 1-18 demonstram que o composto N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina bloqueia eficazmente estresse oxidativo induzido por androgênio em células de câncer da próstata humana e na glândula da próstata de animais TRAMP. Os dados também mostram que MDL 72.527 retarda o tempo de desenvolvimento do tumor em animais TRAMP, resultando em um aumento estatisticamente significativo em OS.

Outro aspecto da invenção é uma síntese melhorada de fazer N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina. MDL 72.527 é um inibidor irreversível potente de poliamina oxidase de mamífero e demonstra um K_i de 0,9 mM contra poliamina oxidase de fígado de porco. Uma síntese conhecida de MDL envolve converter propargilamina protegida com N-Boc no bis(aleno) correspondente, seguido por copulação de 2 equivalentes do aleno

protegido em 1,4-diiodobutano. A desproteção do bis-aleno protegido com N-Boc resultante deu MDL 72.527. A síntese conhecida é problemática em que a natureza eletrofílica da porção aleno deu um número de produtos laterais durante alquilação do diiodeto. O rendimento global é desvantajosamente baixo.

O presente método de fazer N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina tem um rendimento vantajosamente elevado. O presente método também impede a preparação indesejável de produtos laterais. O presente método é descrito na figura 19.

Putrescina comercialmente disponível 1 é um (bis)-N-Boc protegido para produzir o composto 2 (85,2% de rendimento). O composto 2 é usado para alquilar quantidade de 2 equivalentes de brometo de propargila na presença de hidreto de sódio produzindo o composto 3 (59,5% de rendimento). Rendimentos nesta transformação são ainda melhorados usando uma mistura de dimetilformamida ("DMF") e tetraidrofurano ("THF") em uma relação de 1:5. Os grupos propargila no composto 3 são convertidos nos alenos correspondentes na presença de CuBr, formaldeído, e diisopropilamina para dar o composto intermediário 4 (38,7% de rendimento). O composto 4 é desprotegido na presença de HCl para dar a molécula alvo desejada MDL 72.527 (sólido branco, 65,8% de rendimento).

Método de HPLC de quantificação de MDL, poliaminas naturais e seus derivados acetila em extratos de células bem como em soro humano e de animal é padronizado. Assim, as farmacocinéticas e farmacodinâmicas de MDL 72.527 podem ser determinadas.

Sais do presente composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina podem ser um sal farmaceuticamente apropriado (isto é, farmaceuticamente aceitável) incluindo, mas não limitado a sais de adição de ácido formados misturando uma solução do composto MDL com uma solução de um ácido farmaceuticamente aceitável. O ácido farmaceuticamente

aceitável pode ser ácido hidroclórico, ácido metanossulfônico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzóico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbônico ou ácido fosfórico. Vários sais farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e podem ser usados com N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina como os descritos em (Berge SM et al., "Pharmaceutical Salts" J. Pharm. Sd. 66:1-19 (1977) e Haynes DA et al., "Occurrence of pharmaceutically acceptable anions and cations in the Cambridge Structural Database," J. Pharm. Sd. 94:2111-2120 (2005), que são incorporados aqui por referência. Por exemplo, a lista de sais comercialmente vendidos aprovados pelo FDA inclui acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, brometo, edetato de cálcio, cansilato, carbonato, cloreto, citrato, di-hidrocloreto, edetato, edissilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobrometo, hidrocloreto, hidroxinaftoato, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, brometo de metila, nitrato de metila, sulfato de metila, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato e trietiodeto.

O composto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina (ou sal ou solvato do mesmo) pode ser administrado como uma forma de dosagem oral como comprimidos não revestidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina moles ou duras, pós, cápsulas, pelotas, soluções, suspensões, elixires ou emulsões. A forma de dosagem oral pode ser administrada de acordo com um regime de dosagem para obter um efeito terapêutico desejável. A forma de dosagem oral também é definida por uma composição farmacêutica compreendendo o ingrediente ativo farmacêutico (API) e vários veículos aceitáveis/ apropriados (aquosos, não aquosos, soluções, suspensões ou emulsões), excipientes, solventes, aditivos, veículos, estabilizadores, diluentes

inertes, aglutinantes (por exemplo, acácia, amido de milho, gelatina), agentes de desintegração (por exemplo, amido de milho, amido de batata, ácido algínico), lubrificantes (por exemplo, ácido esteárico, estearato de magnésio) e outros.

Por exemplo, veículos aquosos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, gomas, amidos, açúcares, lactose, sacarose, materiais celulósicos, água, misturas de álcool/água, tampão fosfato (0,01- 0,1M, ou mais preferivelmente 0,05 M) e solução salina a 0,9%. Solventes não aquosos incluem, mas não estão limitados a, propileno glicol, polietileno glicol, óleo vegetal (isto é, azeite, oleato de etila, e outros). Vários excipientes apropriados por USP farmaceuticamente aceitáveis também podem ser usados, incluindo, mas não limitados a albumina, gelatina, detergentes (por exemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sais de ácido de biles e outros), agentes solubilizantes (por exemplo, glicerol, polietileno glicerol, e outros), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, e outros), conservantes (por exemplo, timerosal, álcool benzílico, parabeno, e outros), ácidos graxos, ceras, poloxâmeros, poloxaminas, substâncias de volume ou modificadores da tonicidade (por exemplo, lactose, manitol, e outros), polímeros para fixação covalente ou complexação com íons metal, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, agentes hidrogel, lipossomas, agentes de microemulsão, agentes de micelas, agentes milamelares, vesículas multilamelares, agentes fantasma de eritrócitos ou agentes de esferoplastos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de reduzir a concentração de espécies de oxigênio reativo na próstata de um ser humano do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêutica de N' N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as espécies de oxigênio reativo incluem um ou mais membros selecionados dentre o grupo consistindo de peróxido de hidrogênio, superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico.

3. Método de tratar profilaticamente câncer da próstata de um ser humano do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo.

4. Método de tratar câncer na próstata de um ser humano do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que o sal é um sal de di-hidrocloreto.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêutica está na faixa de cerca de 1-100 mg/kg de peso corporal e em que a quantidade terapêutica é dosada na faixa de bi-semanal a diária.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêutica está na faixa de cerca de 10-40 mg/kg de peso corporal, e em que uma quantidade terapêutica é dosada semanalmente.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que uma quantidade terapêutica está em torno de 25 mg/kg de peso corporal, e em que uma quantidade terapêutica é dosada bi-semanalmente.

9. Composição farmacêutica oral, caracterizada pelo fato de compreender:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ingrediente farmacêutico ativo compreendendo N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo, e,

um ou mais membros farmaceuticamente apropriados selecionados dentre o grupo consistindo de um veículo, excipiente, solvente, aditivo, veículo, estabilizador, diluente inerte, aglutinante, agente desintegrante e aglutinante.

10. Composição farmacêutica oral de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de estar em uma forma selecionada dentre o grupo consistindo de comprimido não revestido, comprimido revestido, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina mole, pó, cápsula, grânulo, solução, suspensão, elixir e emulsão.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender:

determinar a reduzida concentração de espécies de oxigênio reativo por medida *ex vivo* de uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender:

determinar a reduzida concentração de espécies de oxigênio reativo por medida *ex vivo* uma relação de fluorescência de hidroetidina oxidada: fluorescência de DNA.

13. Método de inibir acetil poliamina oxidase na próstata de um ser humano do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato do mesmo ao humano.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que uma acetil poliamina oxidase é inibida por pelo menos 50% como comparado com um ser humano do sexo masculino não tratado.

15. Método de determinar estresse oxidativo em tecido humano, caracterizado pelo fato de compreender medir *ex vivo* uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA.

16. Método de determinar estresse oxidativo em tecido humano, caracterizado pelo fato de compreender medir *ex vivo* uma relação de fluorescência de hidroetidina oxidada:fluorescência de DNA.

17. Método de acordo com as reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o tecido humano é tecido da próstata de ser humano do sexo masculino derivado de uma biópsia de tumor.

18. Método de acordo com as reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o tecido humano é retirado de uma biópsia de tumor de uma parte do corpo diferente da próstata.

19. Método de tratar câncer na próstata de um cachorro, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo ao cachorro.

20. Método de reduzir a concentração de espécies de oxigênio reativo em tecido humano, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma quantidade terapêutica de N,N'-bis(2,3- butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato farmaceuticamente apropriado do mesmo ao humano.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que as espécies de oxigênio reativo incluem um ou mais membros selecionados dentre o grupo consistindo de peróxido de hidrogênio, superóxido, radical hidroxila and óxido nítrico.

22. Kit de reagentes para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* ou *in vivo* em uma célula, órgão, ou biópsia de mamífero, caracterizado pelo fato de compreender:

um primeiro componente compreendendo um corante hidroetidina, e,

um segundo componente compreendendo uma coloração de DNA de célula viva.

23. Método de usar o kit como definido na reivindicação 22 para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* em tecido derivado de células, órgãos ou biópsias de mamíferos, caracterizado pelo fato de compreender:

colorir um primeiro tecido com o corante hidroetidina para produzir um primeiro número de unidades de fluorescência,

colorir um segundo tecido com a coloração de DNA de célula viva para produzir um segundo número de unidades de fluorescência, e,

normalizar o primeiro número de unidades de fluorescência para o segundo número de unidades de fluorescência para quantificar a concentração de espécies de oxigênio reativo.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, 11-14 ou 19-21, caracterizado pelo fato de que o sal é um membro selecionado dentre o grupo consistindo de acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, brometo, edetato de cálcio, cansilato, carbonato, cloreto, citrato, di-hidrocloreto, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobrometo, hidrocloreto, hidroxinaftoato,

iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbrometo, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, mitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, e trietiodeto.

25. Composição farmacêutica oral de acordo com as reivindicações 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que o sal é um membro selecionado dentre o grupo consistindo de acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, brometo, edetato de cálcio, cansilato, carbonato, cloreto, citrato, di-hidrocloreto, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobrometo, hidrocloreto, hidroxinaftoato, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbrometo, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, mitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, e trietiodeto.

26. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para abaixar a concentração de uma ou mais espécies de oxigênio reativo na próstata em pelo menos 50% como comparado com as concentrações de espécies de oxigênio reativo em um ser humano do sexo masculino de controle não tratado.

27. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para prevenir ou reduzir a ocorrência e/ou recorrência de câncer da próstata como comparado com um ser humano do sexo masculino de controle não tratado com ou sem um câncer da próstata previamente diagnosticado.

28. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para parar ou reduzir a progressão, morbidez e/ou mortalidade devido ao câncer da

próstata.

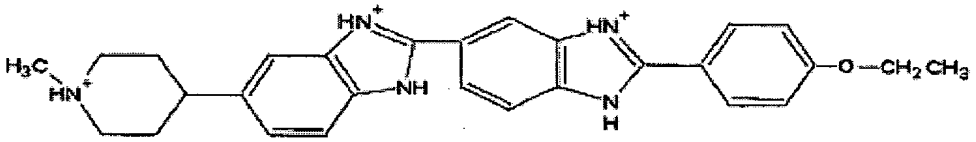
29. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêutica é uma quantidade suficiente para abaixar a concentração de uma ou mais espécies de oxigênio reativo na próstata em pelo menos 50% como comparado com a concentração de espécies de oxigênio reativo em tecido humano não tratado.

30. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender:

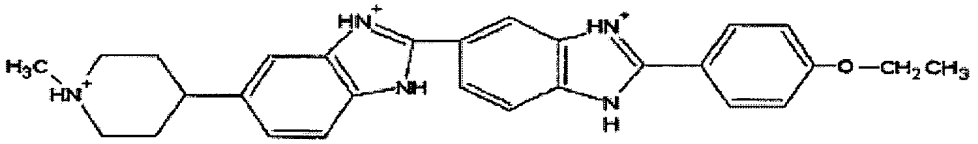
determinar a concentração reduzida de espécies de oxigênio reativo por medida de uma relação de fluorescência de hidroetidina oxidada: fluorescência de DNA *ex vivo*.

31. Método de determinar estresse oxidativo em tecido da próstata de ser humano do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender medir uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA *in vivo*.

32. Kit de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a coloração de DNA de célula viva compreende:



33. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o DNA de célula viva compreende:

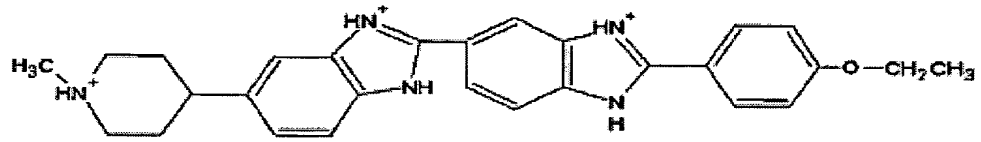


34. Kit de reagentes para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* ou *in vivo* em uma célula, órgão, ou biópsia de mamífero, caracterizado pelo fato de compreender:

um primeiro componente compreendendo um corante de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína, e,

um segundo componente compreendendo uma coloração de DNA de célula viva.

35. Kit de reagentes de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o DNA de célula viva compreende:

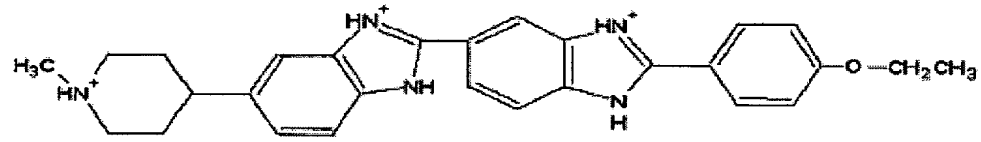


36. Método de usar o kit como definido na reivindicação 34 para medir a concentração de espécies de oxigênio reativo *ex vivo* em tecido derivado de células, órgãos ou biópsias de mamíferos, caracterizado pelo fato de compreender:

colorir um primeiro tecido com o corante de diacetato de 2',7'-dicloro-di-hidrofluoresceína para produzir um primeiro número de unidades de fluorescência,

colorir um segundo tecido com o DNA de célula viva coloração para produzir um segundo número de unidades de fluorescência, e, normalizar o primeiro número de unidades de fluorescência para o segundo número de unidades de fluorescência para quantificar a concentração de espécies de oxigênio reativo.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o DNA de célula viva compreende:



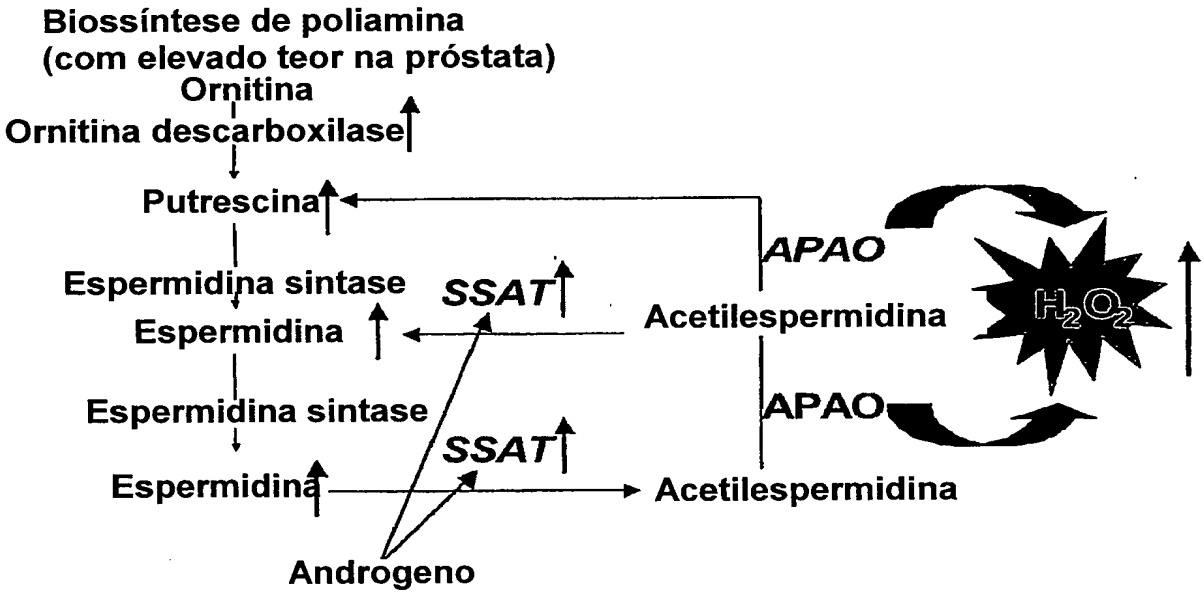

Biossíntese de poliamina
(com elevado teor na próstata)
Ornitina
Ornitina descarboxilase
Putrescina
Espermidina sintase
Espermidina
SSAT
Acetilespermidina
APAO
H_2O_2
Espermidina sintase
SSAT
APAO
Espermidina
Acetilespermidina
Androgeno

FIG. 1

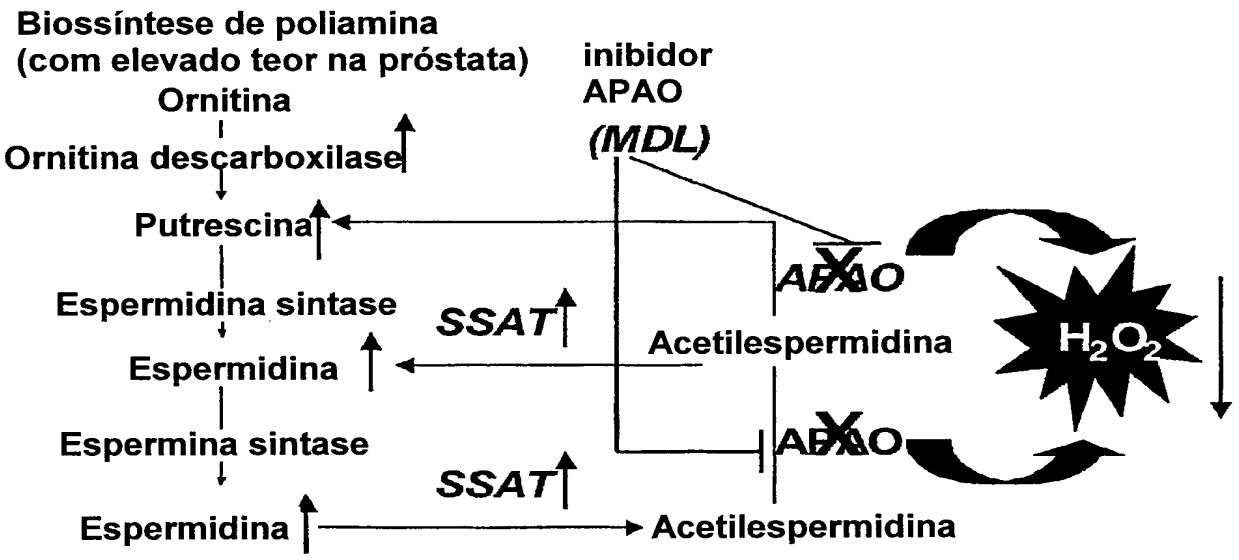

Biossíntese de poliamina
(com elevado teor na próstata)
Ornitina
Ornitina descarboxilase
Putrescina
Espermidina sintase
Espermidina
Espermina sintase
Espermidina
inibidor
APAO
(MDL)
APAO
SSAT
Acetilespermidina
APAO
SSAT
Acetilespermidina
H2O2

FIG. 2

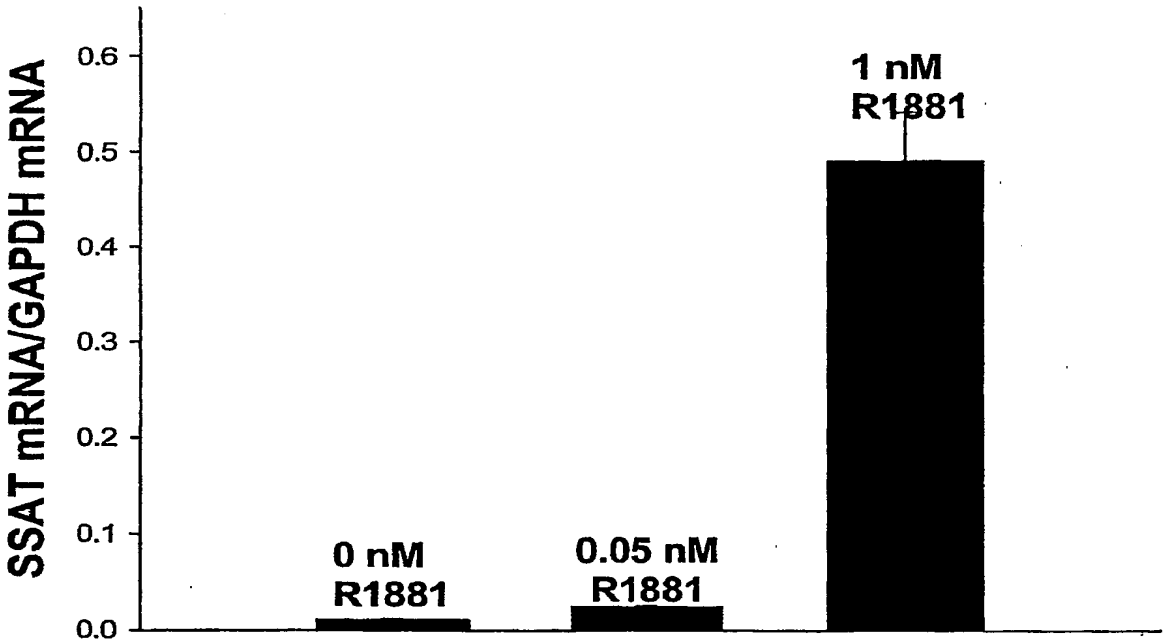

SSAT mRNA/GAPDH mRNA
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0 nM R1881
0.05 nM R1881
1 nM R1881

FIG. 3

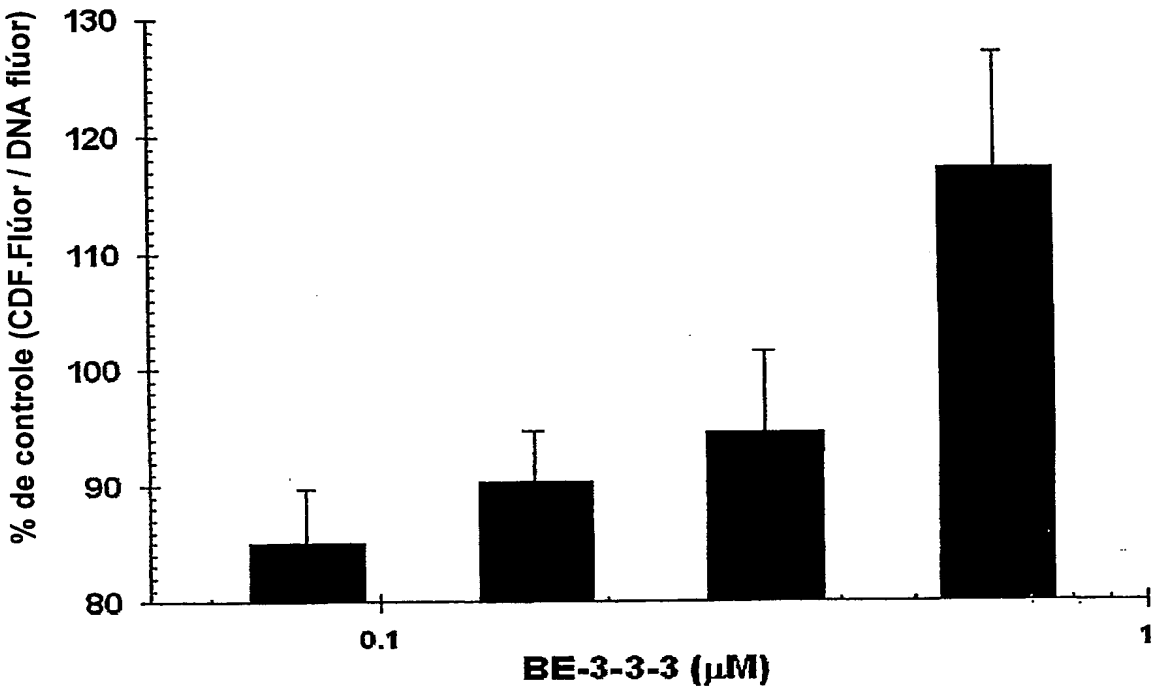

% de controle (CDF.Flúor / DNA flúor)
130
120
110
100
90
80
0.1
1
BE-3-3-3 (μM)

FIG. 4

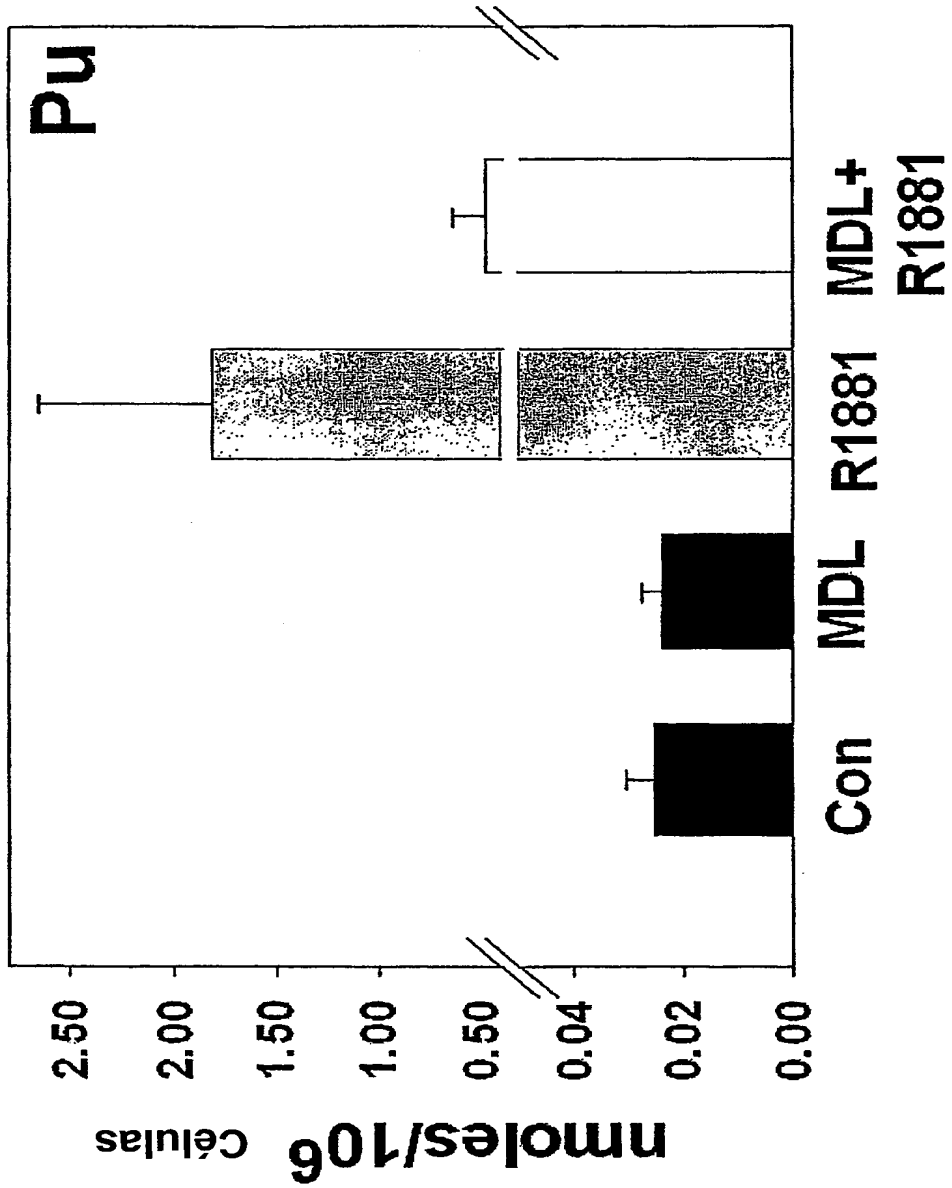

Pu
nmoles/10⁶ células
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.04
0.02
0.00
Con
MDL
R1881
MDL+
R1881

FIG. 5A

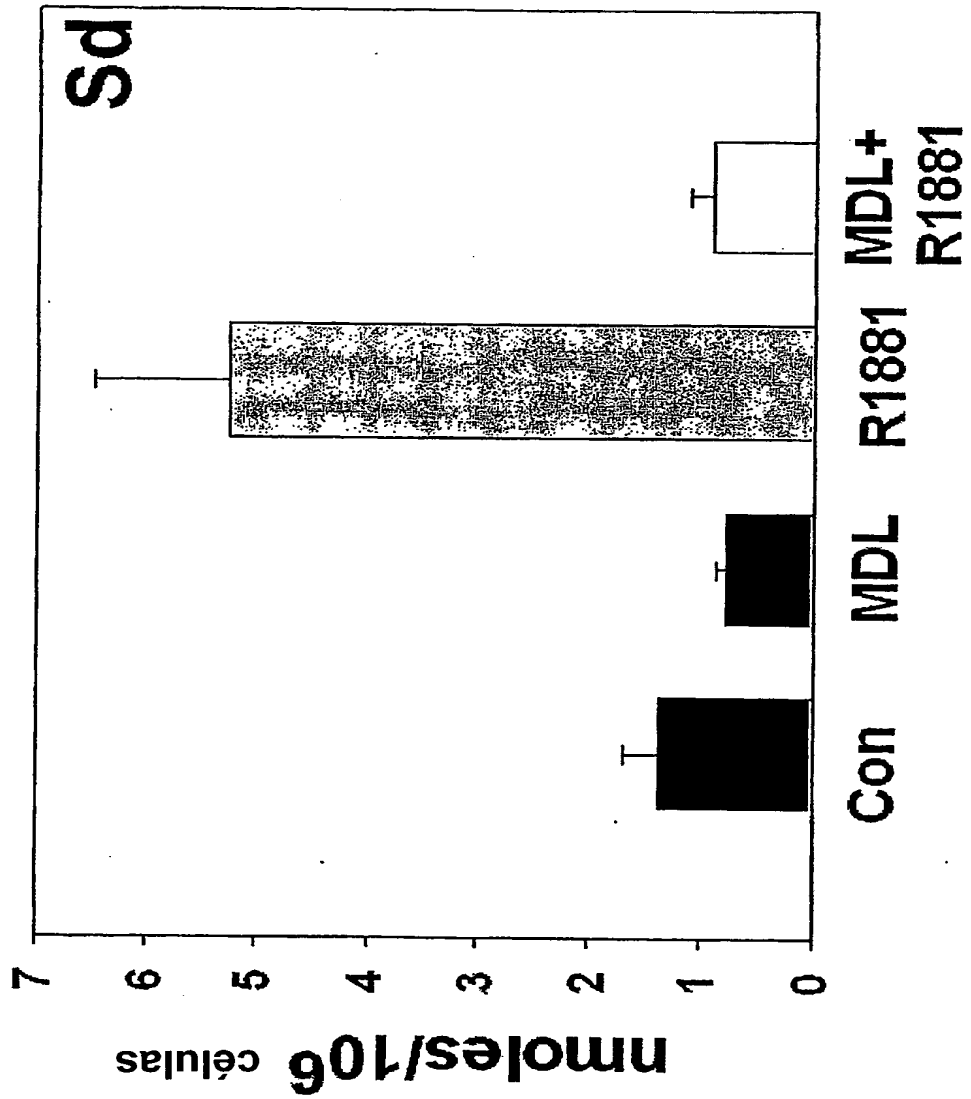


FIG. 5B

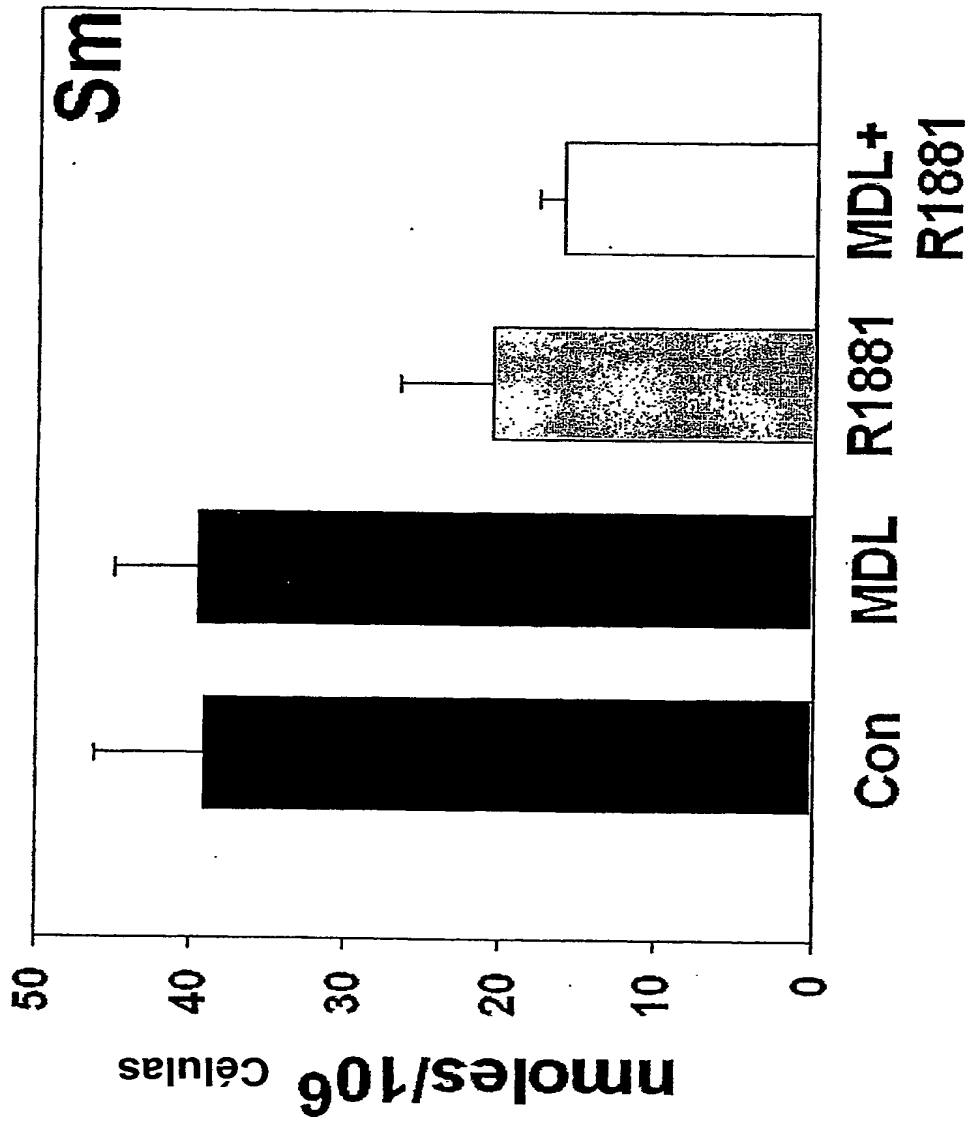


FIG. 5C

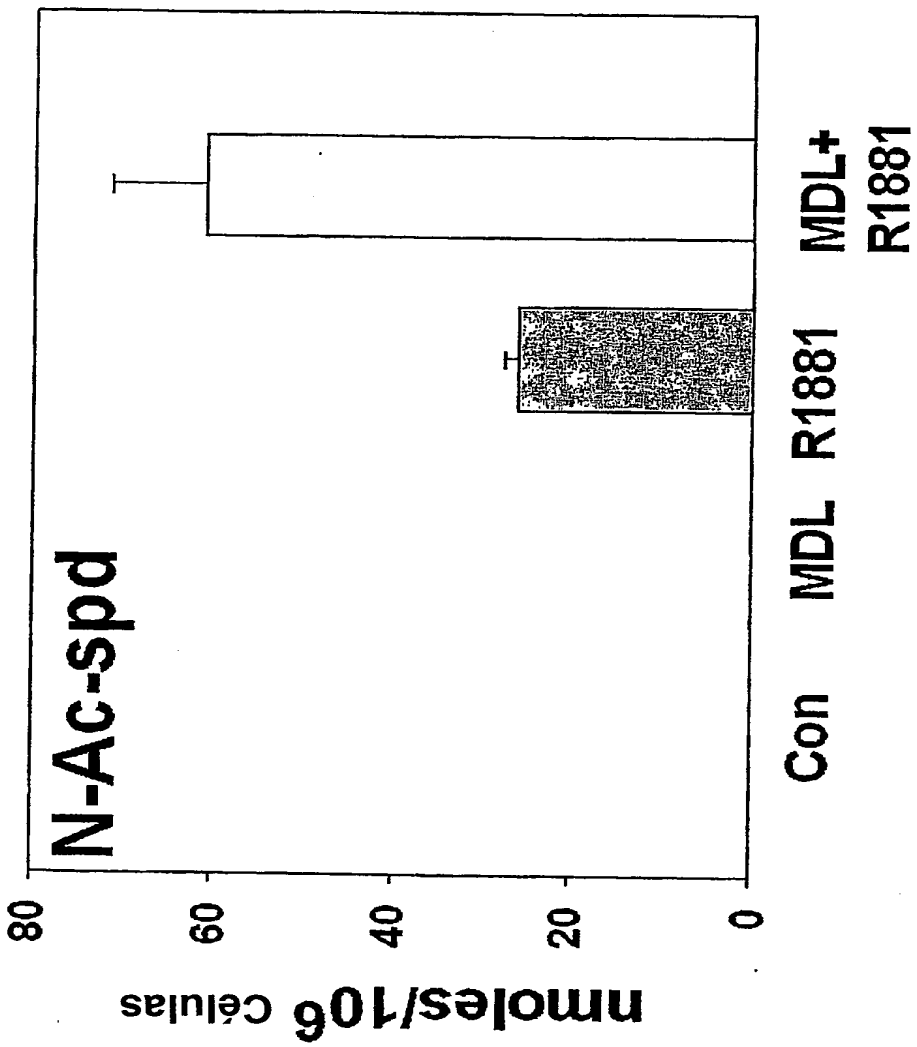

N-Ac-spd
nmoles/10⁶ células
80
60
40
20
0
Con
MDL
R1881
MDL+
R1881

FIG. 5D

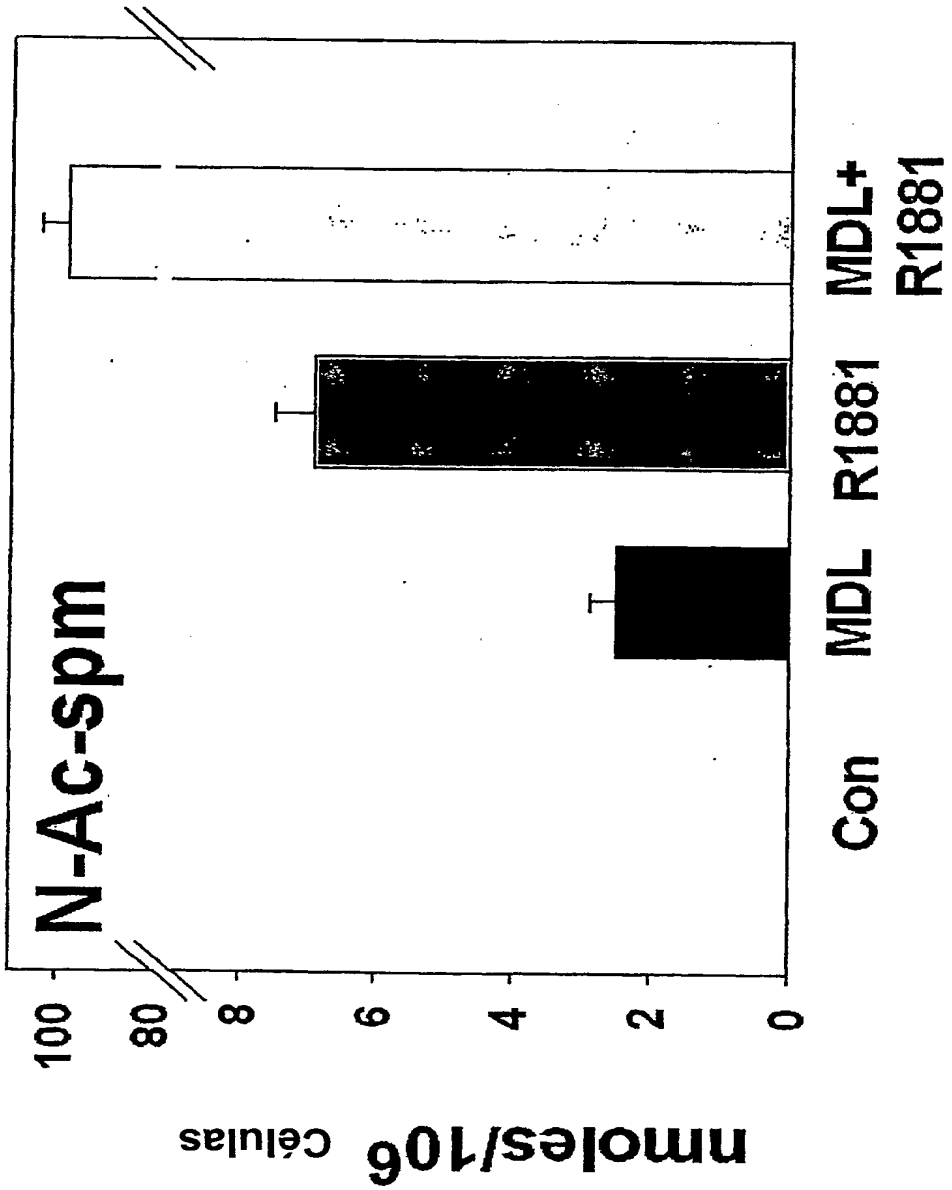

N-Ac-spm
nmoles/10⁶ células
100
80
8
6
4
2
0
Con
MDL
R1881
MDL+
R1881

FIG. 5E

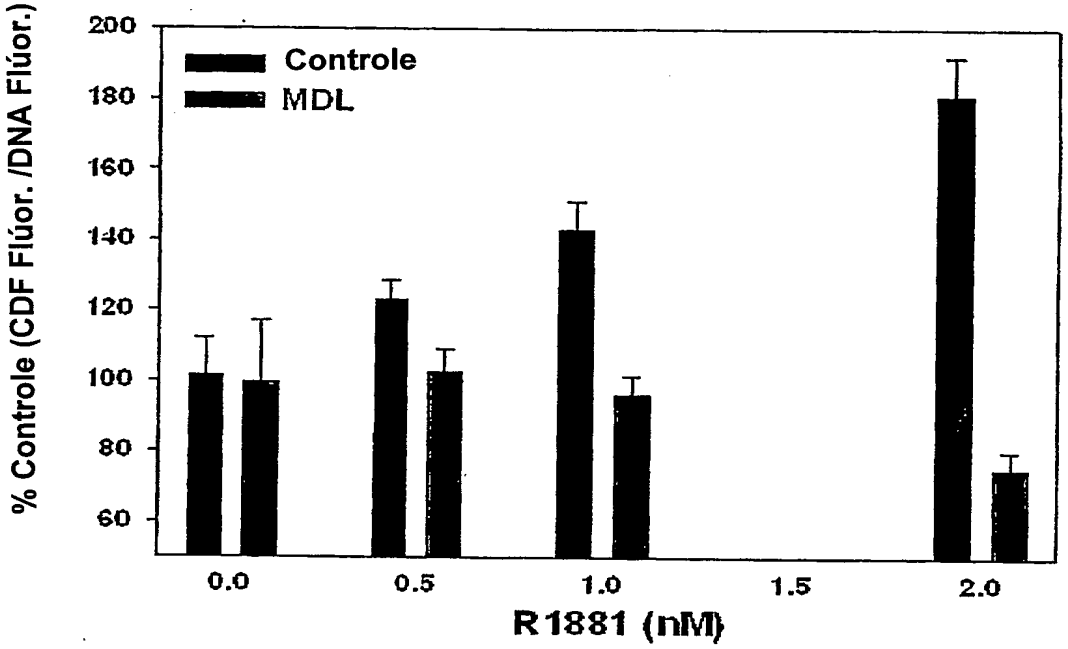

% Controle (CDF Flúor. /DNA Flúor.)
200
180
160
140
120
100
80
60
Controle
MDL
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
R1881 (nM)

FIG. 6



FIG. 7A

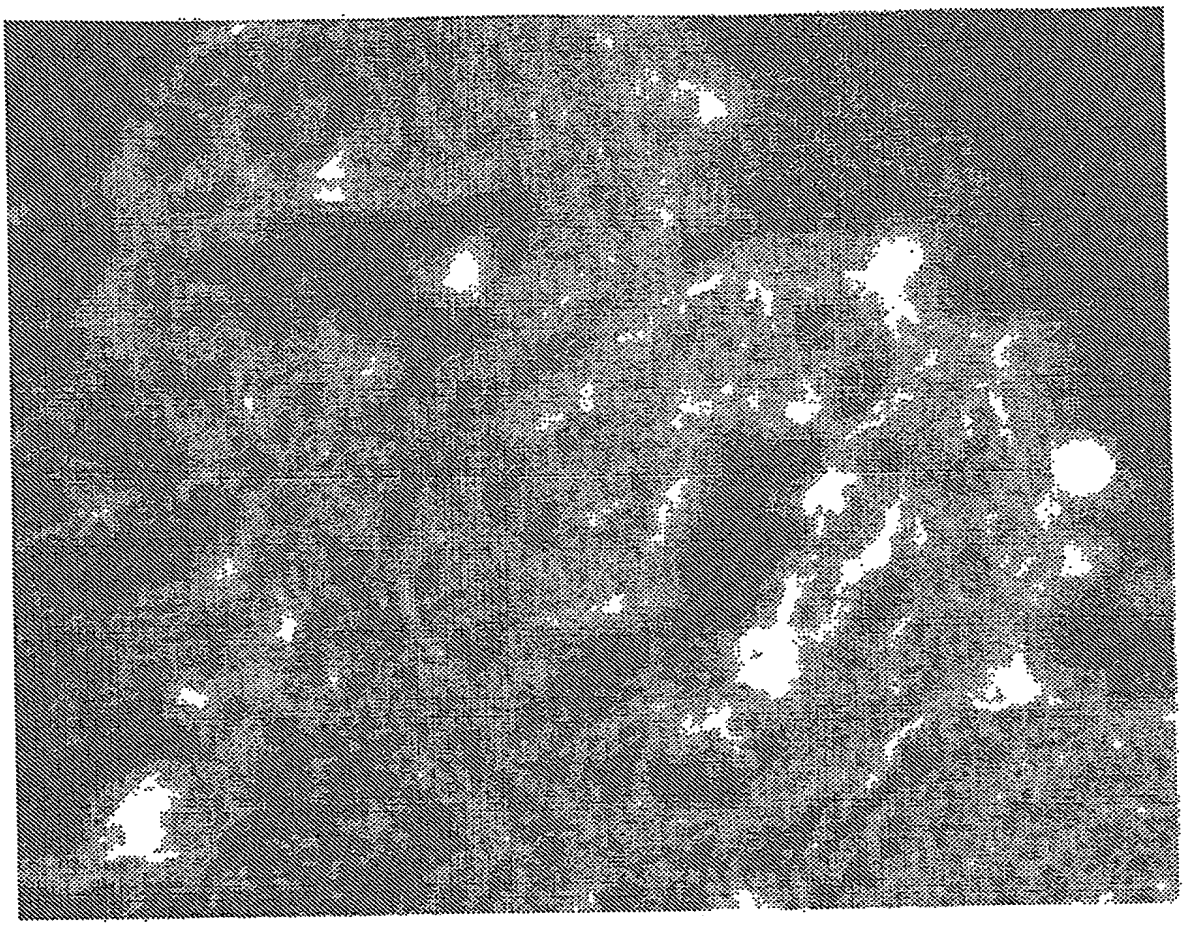


FIG. 7B

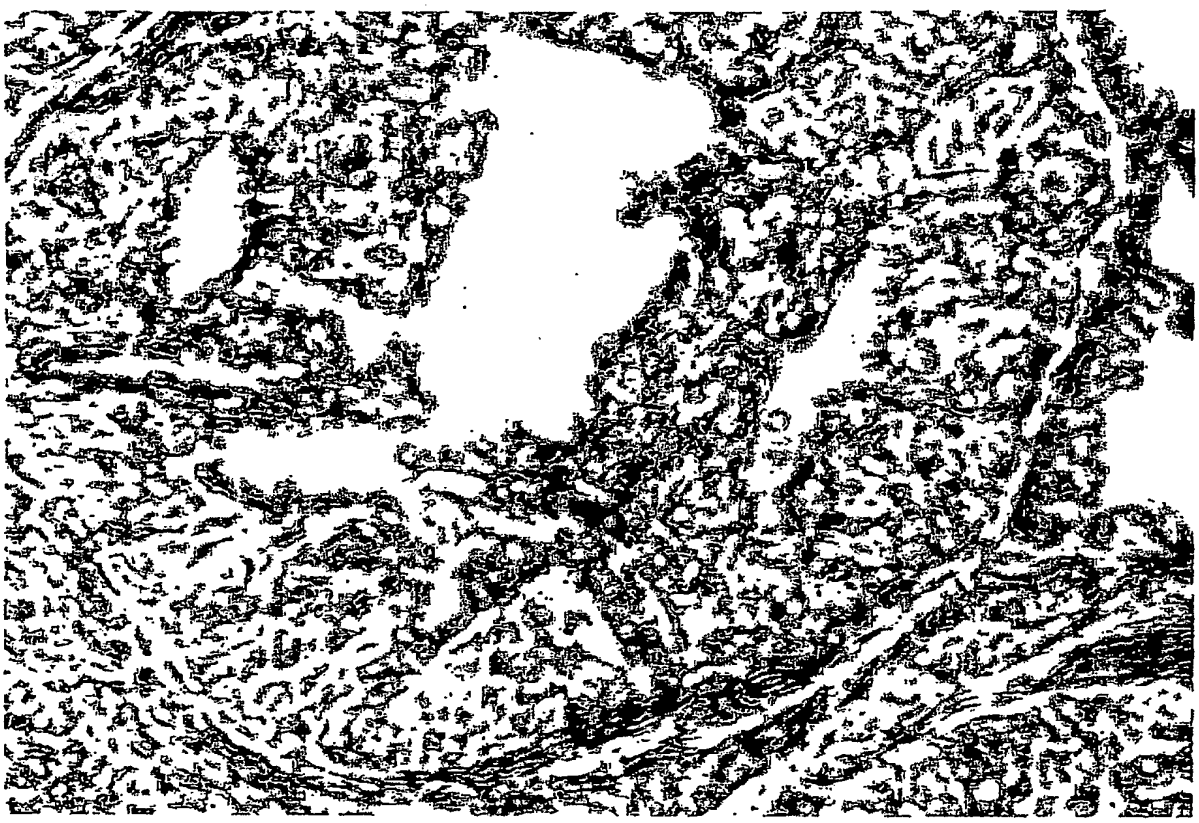


FIG. 7C

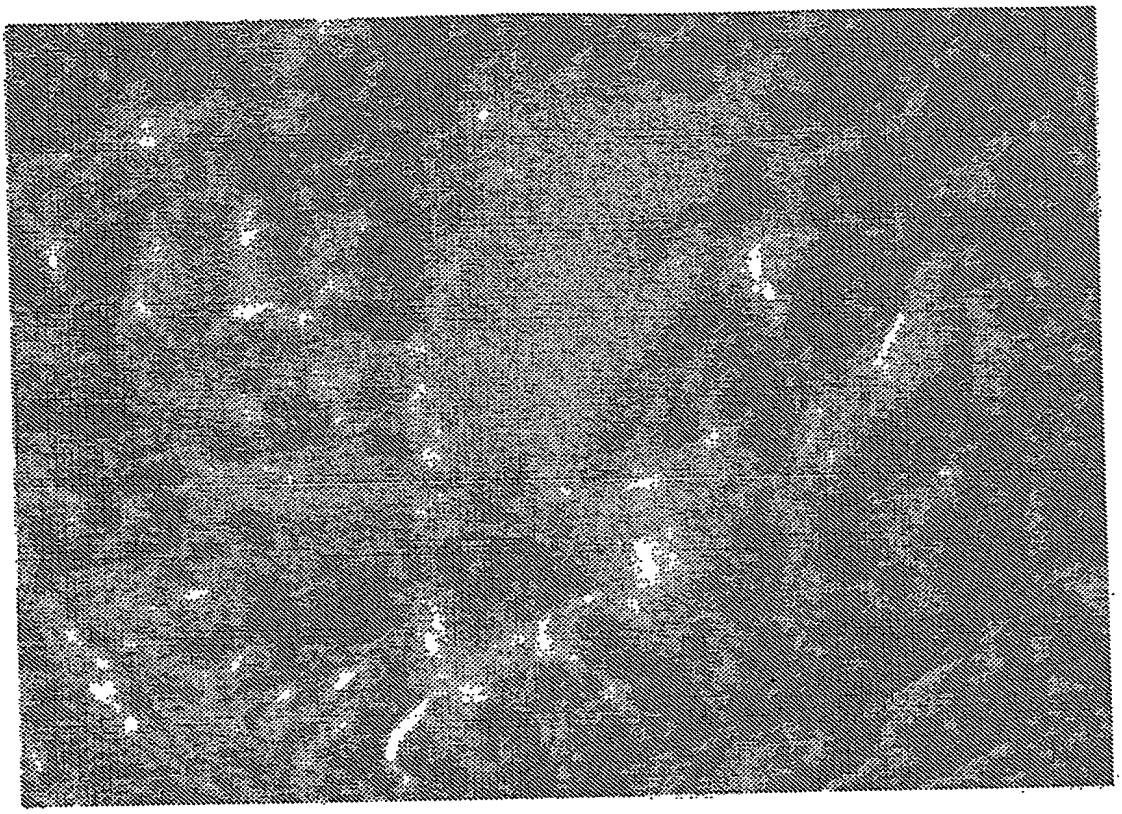


FIG. 7D

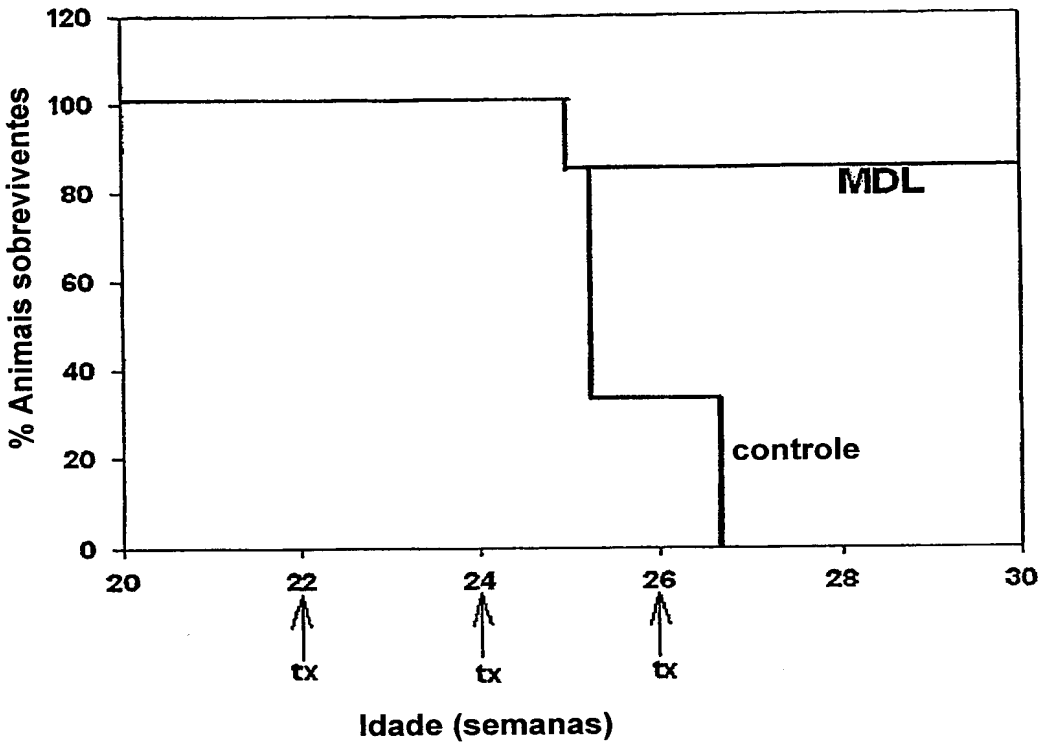

120
100
80
60
40
20
0
% Animais sobreviventes
MDL
controle
20
22
24
26
28
30
tx
tx
tx
Idade (semanas)

FIG. 8

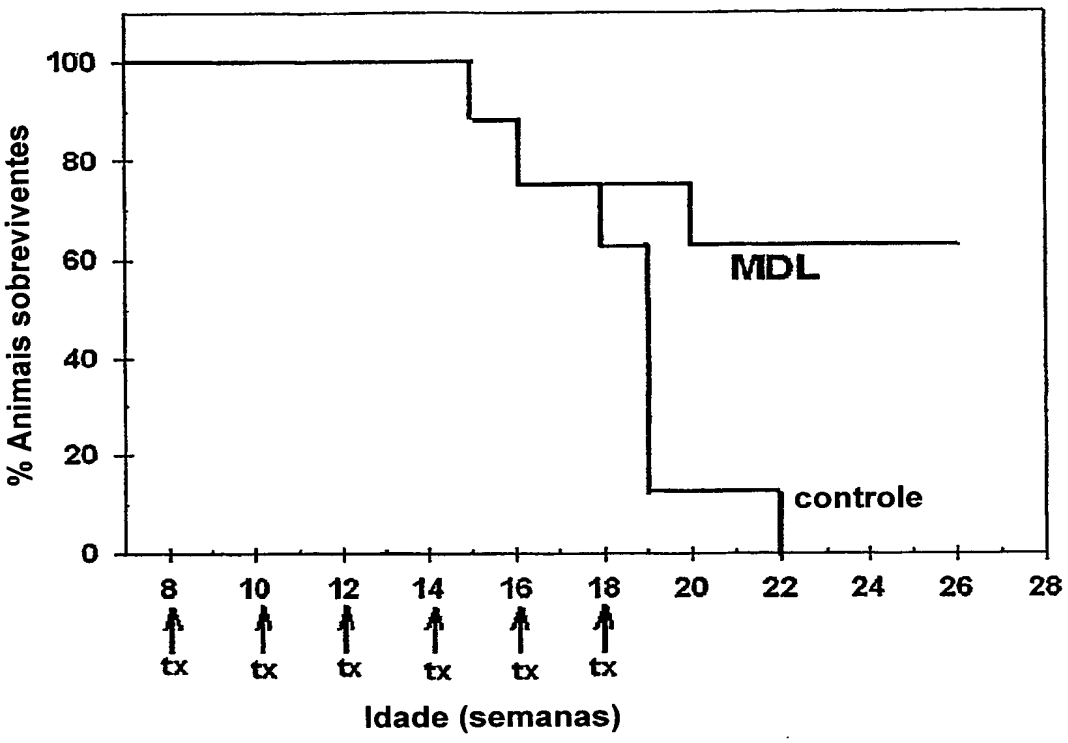

100
80
60
40
20
0
% Animais sobreviventes
MDL
controle
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
tx
tx
tx
tx
tx
tx
Idade (semanas)

FIG. 9

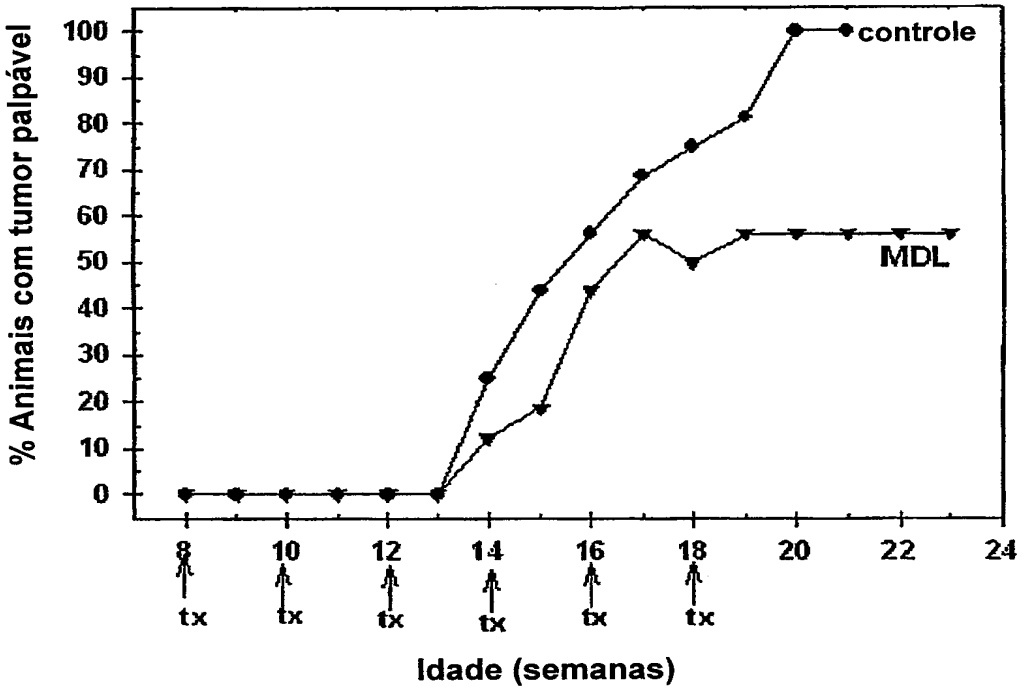

% Animais com tumor palpável
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
controle
MDL
8
10
12
14
16
18
20
22
24
tx
tx
tx
tx
tx
tx
Idade (semanas)

FIG. 10

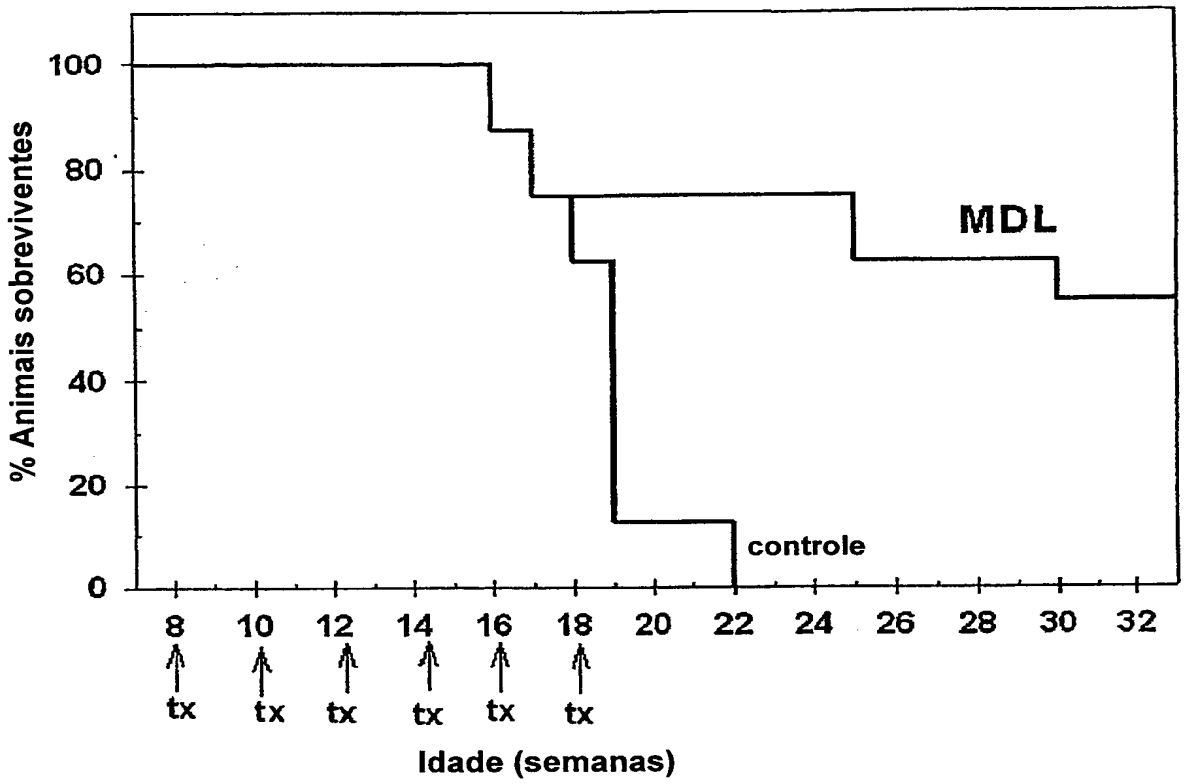

100
80
60
40
20
0
% Animais sobreviventes
MDL
controle
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
tx
tx
tx
tx
tx
tx
Idade (semanas)

FIG. 11

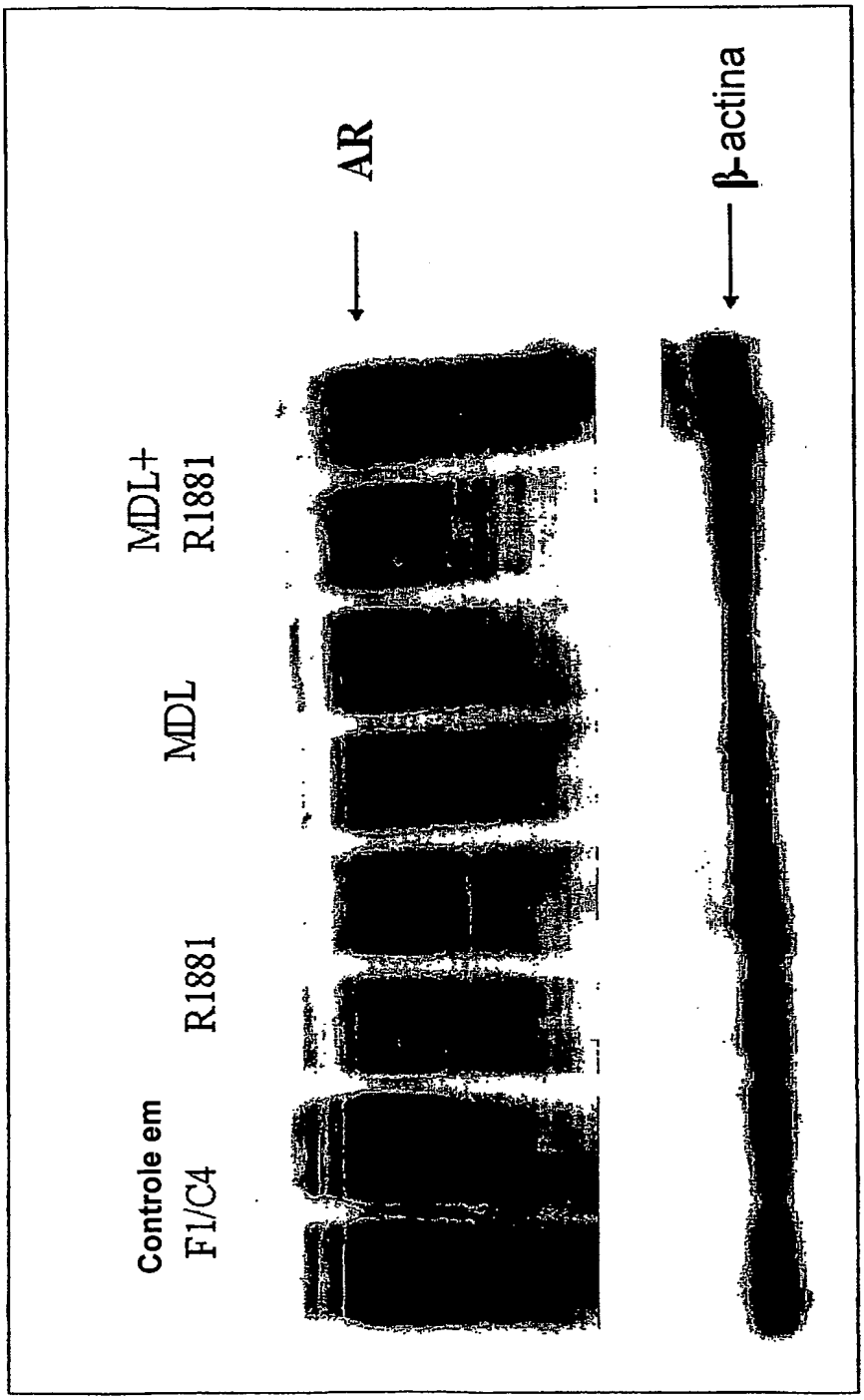


FIG. 12

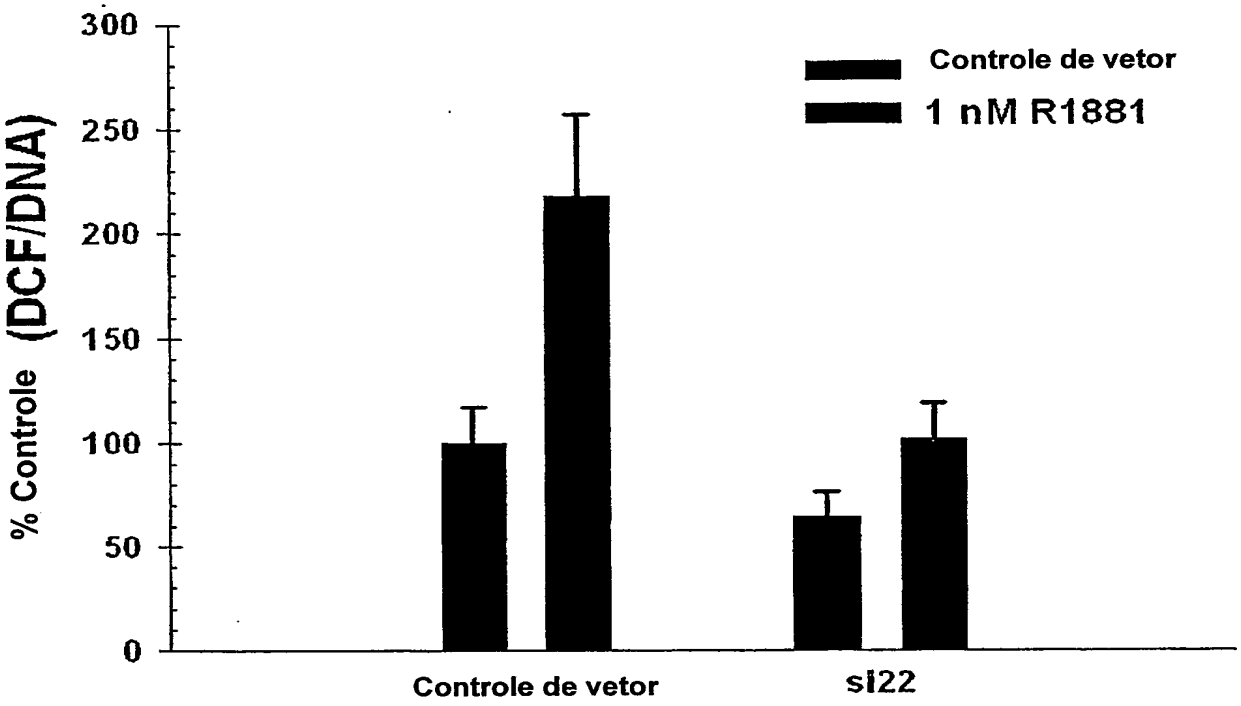

300
250
200
150
100
50
0
% Controle (DCF/DNA)
Controle de vetor
1 nM R1881
Controle de vetor
si22

FIG. 13

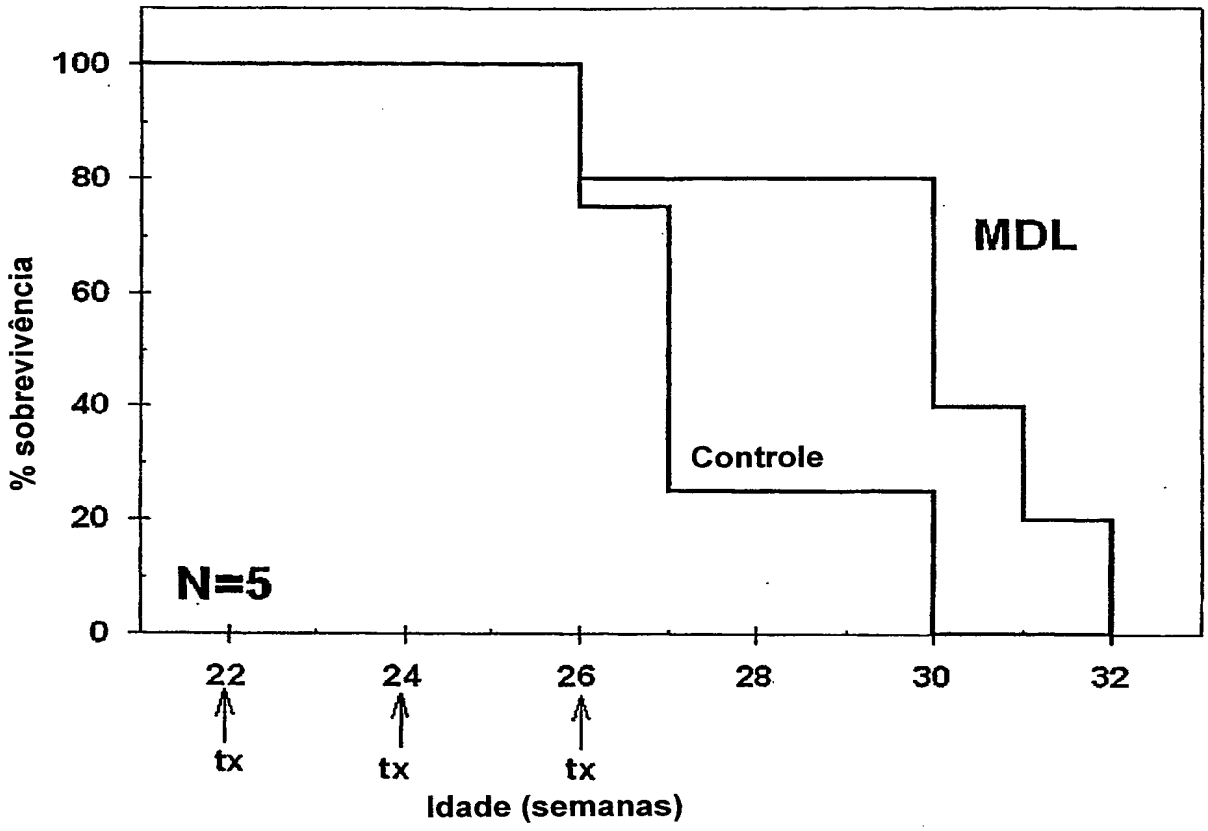

100
80
60
40
20
0
% sobrevivência
MDL
Controle
N=5
22
24
26
28
30
32
tx
tx
tx
Idade (semanas)

FIG. 14

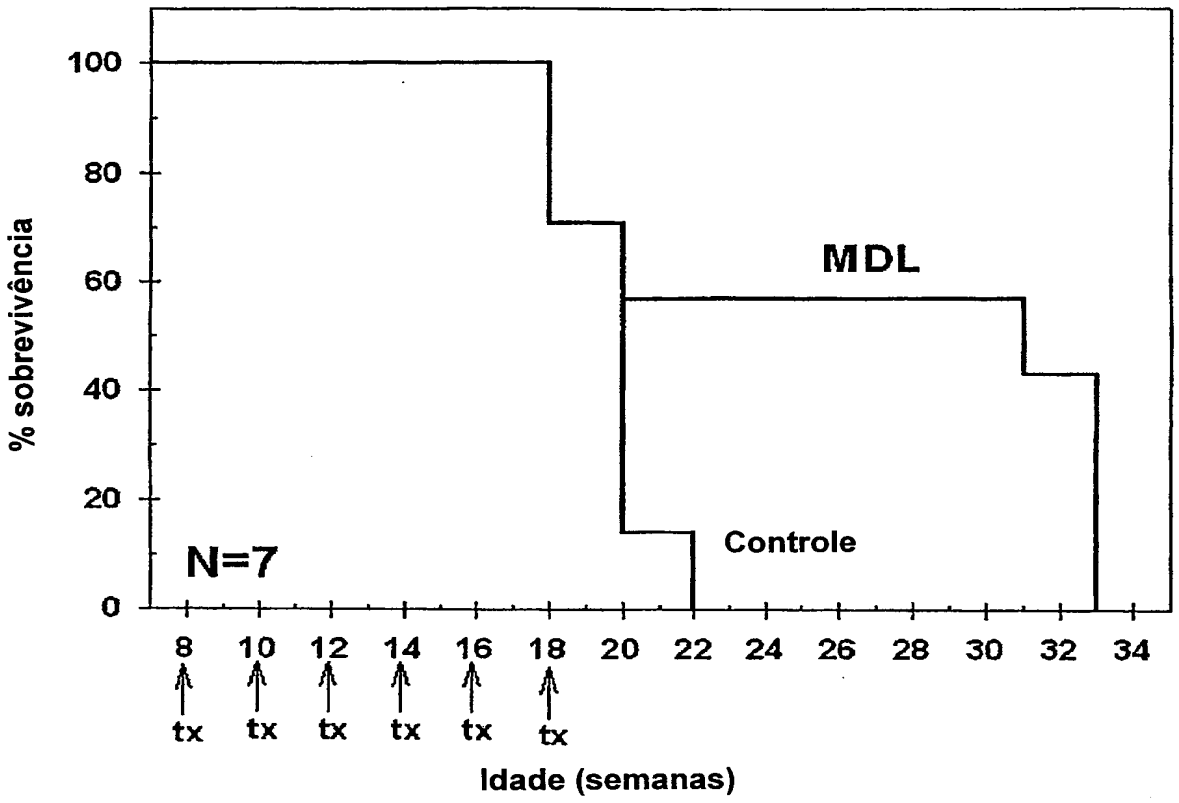

100
80
60
40
20
0
% sobrevivência
MDL
Controle
N=7
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
tx
tx
tx
tx
tx
tx
Idade (semanas)

FIG. 15

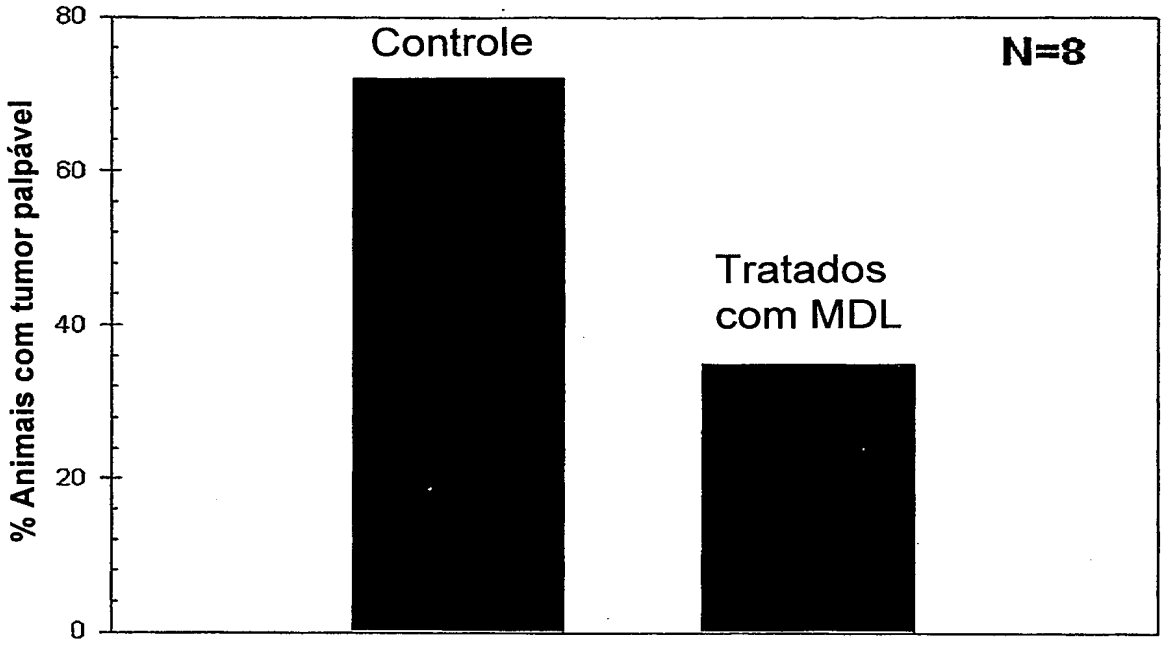

80
60
40
20
0
% Animais com tumor palpável
Controle
N=8
Tratados
com MDL

FIG. 16

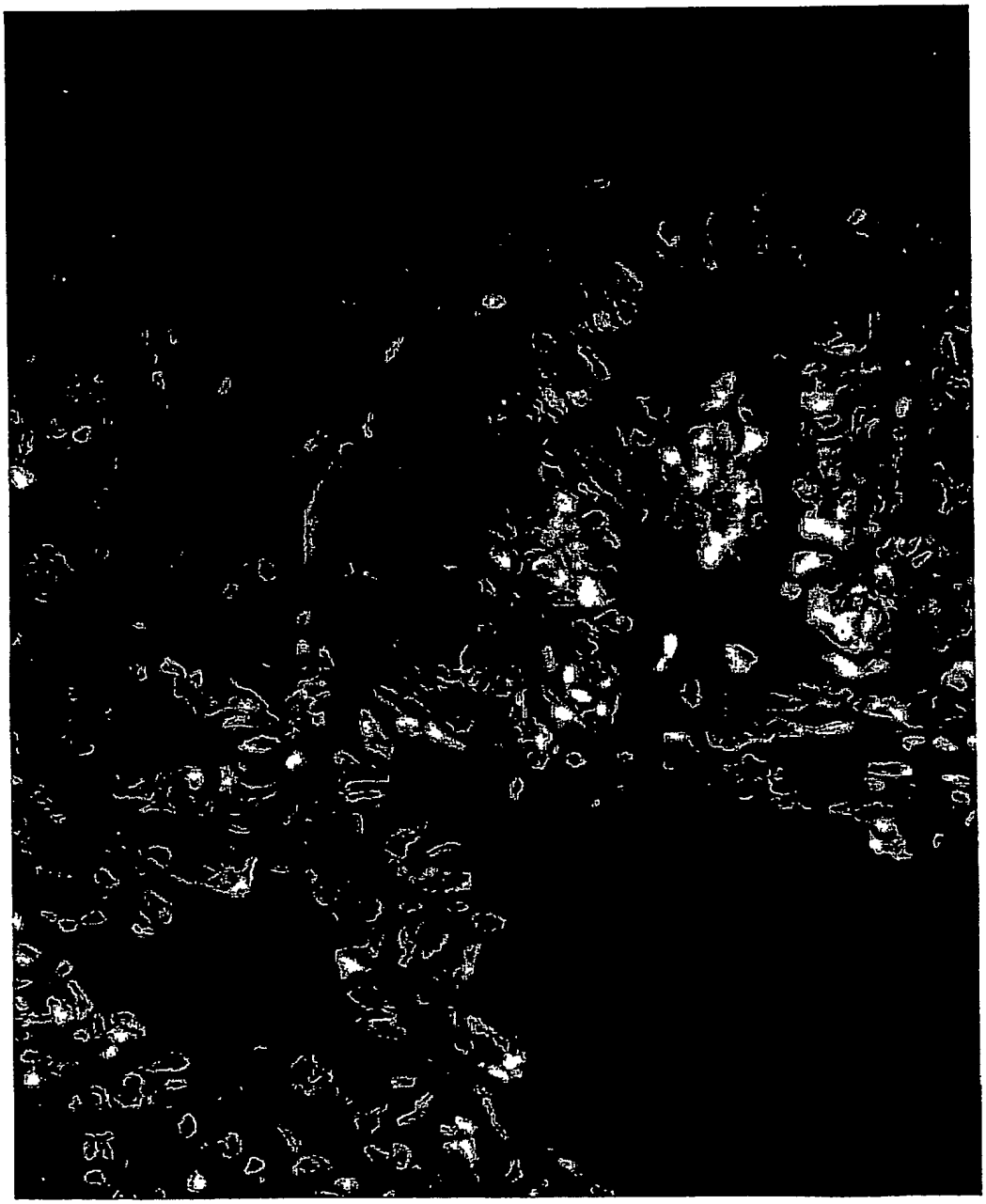


FIG. 17

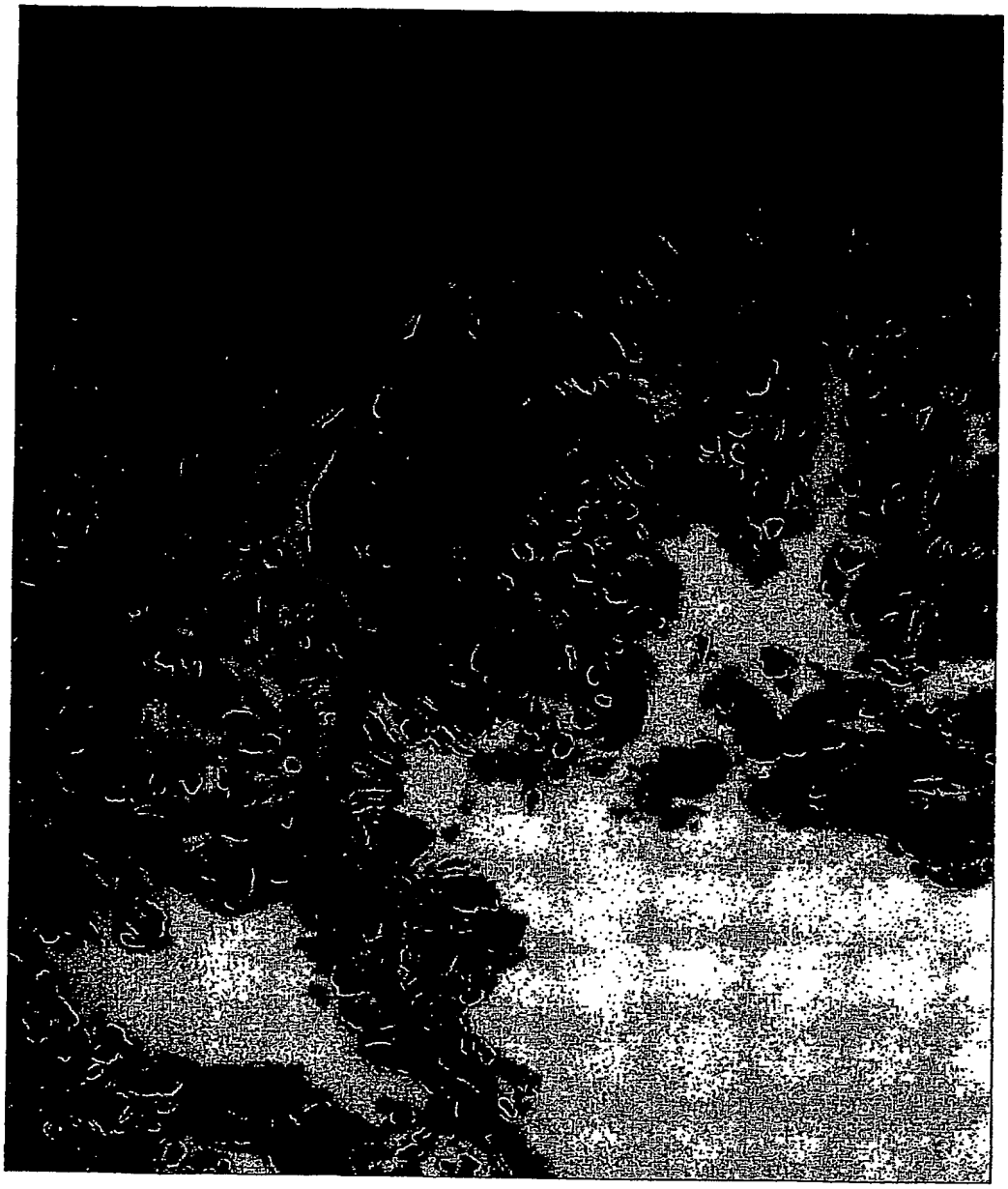


FIG. 18

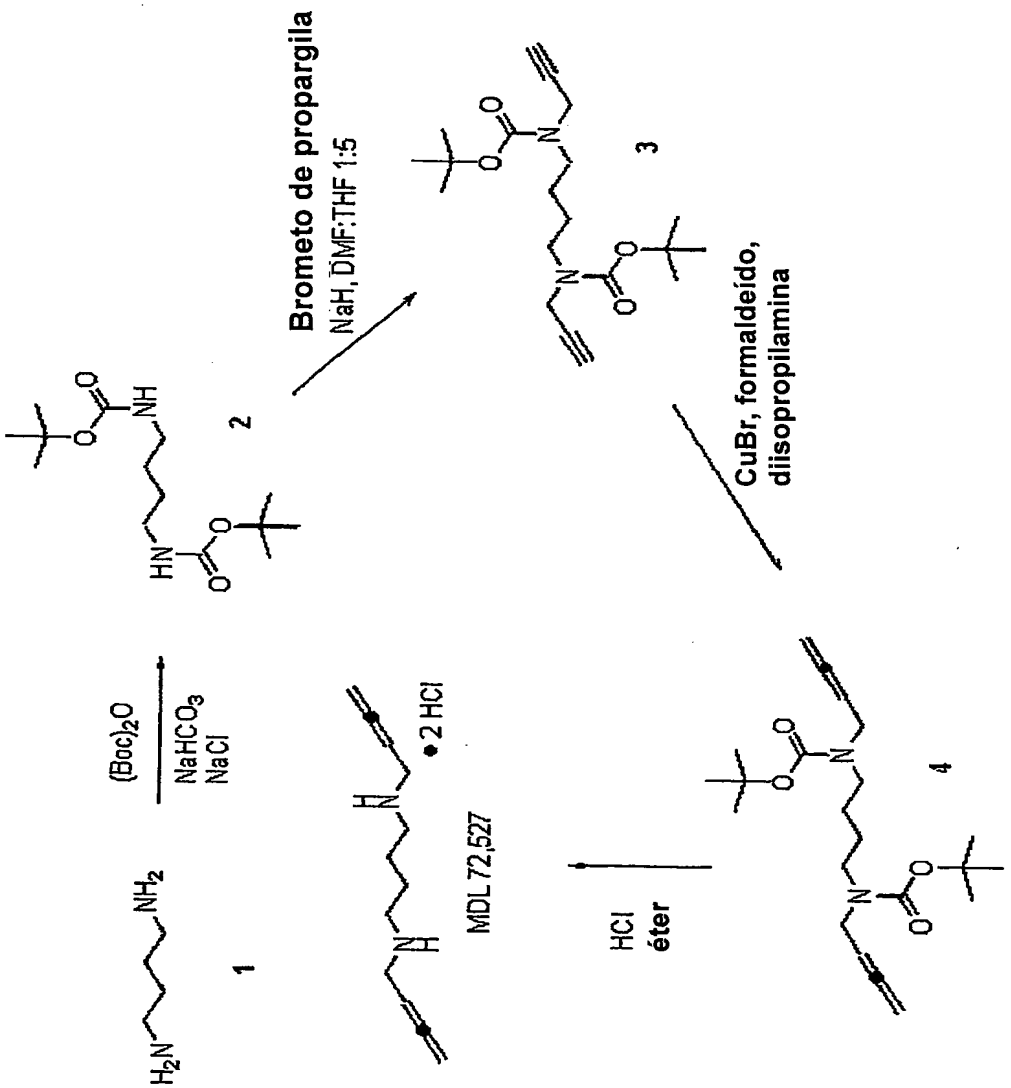

(Boc)2O
NaHCO3
NaCl
1
2
Brometo de propargila
NaH, DMF:THF 1:5
3
CuBr, formaldeído,
diisopropilamina
4
HCl
éter
• 2 HCl
MDL 72,527

FIG. 19

RESUMO

"MÉTODOS DE REDUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR PROFILATICAMENTE CÂNCER DA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE INIBIR ACETIL POLIAMINA OXIDASE NA PRÓSTATA DE UM SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO HUMANO, DE TRATAR CÂNCER NA PRÓSTATA DE UM CACHORRO, DE REDUZIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO EM TECIDO HUMANO, DE USAR O KIT, E DE DETERMINAR ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDO DA PRÓSTATA DE SER HUMANO DO SEXO MASCULINO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ORAL, E, KIT DE REAGENTES PARA MEDIR A CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO *EX VIVO* OU *IN VIVO* EM UMA CÉLULA, ÓRGÃO, OU BIÓPSIA DE MAMÍFERO"

Di-hidrocloreto de N1,N4-bis(buta-1,3-dienil)butano-1,4-diamina (também referido como MDL 72.527 e di-hidrocloreto de N,N'-di-2,3-butadienil-1,4-butanodiamina) ou sais ou solvatos dos mesmos, seu uso como um antioxidante, seu uso na prevenção e/ou tratamento de câncer da próstata em seres humanos do sexo masculino, e seu uso na redução da concentração de espécies de oxigênio reativo em tecido de glândula da próstata humana ou qualquer outro tecido do corpo, e métodos de fazer o composto para o mesmo. Outros métodos incluem inibir a acetil poliamina oxidase em tecido da próstata humana ou outro tecido do corpo humano compreendendo a administração de uma quantidade terapêutica de N,N1-bis (2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina ou um sal ou solvato do mesmo ao humano, e um método de determinar estresse oxidativo em tecido da próstata

humana ou outro tecido do corpo humano ou animal compreendendo medir uma relação de fluorescência de diacetato de 2',7'- dicloro-di-hidrofluoresceína oxidado: fluorescência de DNA e fluorescência de corante de hidroetidina *ex vivo* ou *in vivo*.

5