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

(21) **PI0707563-4 A2**

BRPI0707563A2

(22) Data de Depósito: 09/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/404
A61K 47/10

(54) Título: **TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA UTILIZANDO EO9 E PROPILENO GLICOL**

(30) Prioridade Unionista: 09/02/2006 US 60/771.678

(73) Titular(es): Spectrum Pharmaceuticals, Inc.

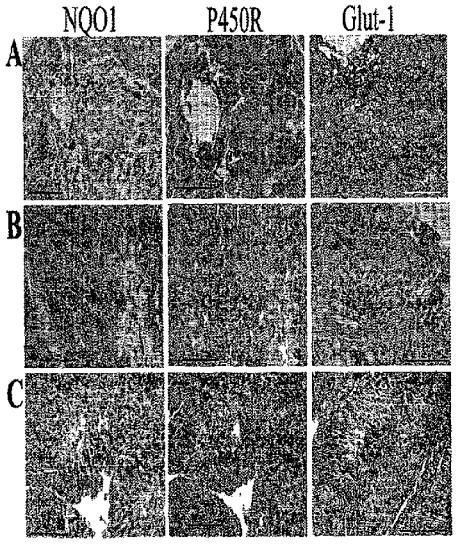
(72) Inventor(es): Dorla Mirejovsky, Guru Reddy, Luigi Lenaz

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007061951 de 09/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/092964de 16/08/2007

(57) Resumo: TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA UTILIZANDO EO9 E PROPILENO GLICOL. São divulgados aqui vários tratamentos para o câncer da bexiga e os métodos. A presente divulgação pode tirar vantagem de concentrações de propileno glicol e/ou NAD (P) H:quinona oxirredutase-1 (NQOl), citocromo P450 oxirredutase (P45 OR) e o transportador 1 de glicose (Glut 1) e da expressão de proteínas na célula transicional humana do carcinoma de bexiga para oferecer tratamentos de câncer de bexiga individualmente direcionados.



PI0707563-4

"TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA UTILIZANDO EO9 E PROPILENO GLICOL"

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDO RELACIONADO.

O presente Pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório de Patente Americana N°. 60/771.678, arquivado em 09 de fevereiro de 2006.

CAMPO DA INVENÇÃO.

A presente invenção se refere ao tratamento do câncer de bexiga utilizando formulações de EO9 e métodos. A presente invenção pode tirar vantagem de concentrações de propileno glicol e/ou da expressão das proteínas NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1), citocromo P450 oxirredutase (P450R) e do transportador 1 de glicose (Glut-1) na célula transicional humana do câncer da bexiga para oferecer tratamentos individualmente direcionados do câncer de bexiga.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO.

O câncer de bexiga é o sétimo câncer mais comum em todo o mundo. Em 2000, foi o quarto câncer mais comum em homens no Reino Unido com 9.000 novos casos diagnosticados naquele ano (1). Em 2002, houve aproximadamente 280.000 casos do câncer de bexiga na Europa e mais de 60.000 novos casos foram esperados nos Estados Unidos para 2004.

O tipo mais comum do câncer de bexiga (aproximadamente 90 %) é o carcinoma da célula transicional (TCC) que se deriva do urotélio, ou do revestimento celular do sistema uretral (ureteres, bexiga e uretra). O carcinoma da célula transicional (TCC) pode ser classificado como ou superficial

(pTa e pT1) ou músculo invasivo (> pT2). O tratamento do TCC superficial é atualmente ressecção transuretral (TURBT; isto é, a remoção cirúrgica de todas as lesões visíveis) seguido por quimioterapia adjuvante ou imunoterapia. A validade de tal tratamento é apoiada pela redução significativa da recorrência do tumor superficial observada depois da quimioterapia adjuvante, quando em comparação com a TURBT sozinha (2). Embora os reagentes, tais como a Mitomicina C (MMC), a Epirubicina e a BCG sejam rotineiramente usados, é amplamente reconhecido que existe uma necessidade para desenvolver ou agentes mais potentes e/ou menos tóxicos contra o TCC ou utilizar melhor a terapêutica atual em termos de um tratamento direcionado de indivíduos (ou de subgrupos patológicos) que também será beneficiados.

A Mitomicina C (MMC) é um agentge anti-neoplásico à base de quinona de ocorrência natural que pertence a uma classe de compostos conhecidos como drogas biorredutoras (3). Em geral, as drogas biorredutoras são pró-drogas que necessitam da ativação metabólica para gerar os metabólitos citotóxicos e são todos projetadas em princípio em exterminar células hipóxicas que residem nas regiões pobremente perfundidas dos tumores sólidos. Estas drogas, contudo, também podem ser direcionadas para as porções aeróbicas dos tumores.

Os parâmetros-chave que determinam a seletividade citotóxica das drogas biorredutoras à base de quinona (isto é, entre as células tumorais hipóxicas e aeróbicas) são a presença de determinadas redutases enzimáticas necessárias

para reduzir a pró-droga e a capacidade do oxigênio molecular para reverter o processo de ativação (4,5) (embora o papel relativo das redutases e da tensão de oxigênio na determinação da morte celular varie dependendo do composto em questão (4,6)). O fato da MMC ser rotineiramente usada no tratamento do TCC sugere que esta doença não possua somente a engrenagem bioquímica adequada necessária para a ativação biorredutora, mas que outros compostos nesta classe também possam ser úteis no tratamento desta doença. Dois exemplos de compostos adicionais que também podem ser úteis incluem o EO9 derivado da indolequinona e a aziridinil benzoquinona RH1 (7,8).

Tal com declarado, a capacidade das drogas biorredutoras à base de quinona em exterminar as células aeróbicas ou as hipóxicas é basicamente determinada por uma relação complexa entre enzimologia do tumor incluindo a presença de redutases e a hipoxia. Várias redutases foram implicadas na ativação de drogas biorredutoras (4,6) embora uma atenção considerável tenha sido dada às enzimas citocromo P450 redutases (P450R) e NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1). Com relação à medição da hipoxia, foi mostrado que os marcadores endógenos, tais como o transportador 1 de glicose (Glut 1) ou a anidrase carbônica IX (CAIX) estão em correlação com os marcadores de hipoxia exógenos, tais como o pimonidazol (9,10). Assim, a relação entre a hipoxia do tumor e a expressão de duas redutases chave nos carcinomas das células transicionais superficiais e invasivas (TCC) da bexiga é de uma importância primordial. Além disso, o uso de preparações

farmacêuticas para o tratamento do câncer de bexiga com perfis variados de penetração é necessário para atingir os tumores superficiais contra os músculo invasivos. A presente invenção se refere a esses aspectos dos tratamentos do câncer de bexiga.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO.

Diferenças significativas foram encontradas na expressão da NQO1 entre tumores superficiais e invasivos com baixos níveis observados nos tumores músculo invasivos. Ao contrário a P450R e o Glut 1 foram expressados em todas as etapas e graus do TCC embora a expressão aumentasse com o estágio do tumor (particularmente no caso da Glut 1). Além disso, a expressão do Glut 1 foi significativamente elevada em tumores G3 enquanto existiam baixos níveis de NQO1. Estes resultados demonstraram que existem diferenças marcantes nas expressões da NQO1 e do Glut 1 entre o TCC da bexiga superficial e invasivo. Além disso, foram encontradAs preparações farmacêuticas de drogas biorredutoras à base de quinona com diferentes perfís de penetração.

Estes resultados trazem implicações terapêuticas para as drogas biorredutoras à base de quinona de modo que aquele único agente terapêutico seria apropriado para a doença superficial enquanto que seria desejável para a doença músculo invasiva, uma terapia combinada usando quinonas para visar as frações hipóxicas e outras modalidades para exterminar as frações aeróbicas. Além disso, as preparações farmacêuticas com perfis de penetração mais baixos podem ser adotadas para o tratamento de câncer superficiais de bexiga

enquanto As preparações farmacêuticas com perfis de penetração maiores podem ser adotadas para o tratamento dos cânceres de bexiga mais músculo invasivos. Tomado em conjunto, esses aspectos da presente invenção fornecem avanços importantes no tratamento do câncer de bexiga permitindo a elaboração de tratamentos de câncer para determinadas características do perfil da doença em um indivíduo.

Especificamente, uma modalidade de acordo com a presente invenção inclui um método para tratar o câncer de bexiga compreendendo a determinação dos níveis de pelo menos uma enzima dentro de um tumor e a escolha de um tratamento à base de pelo menos um nível de enzima em que o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona ou sozinha ou em combinação com outro tratamento.

Em outra modalidade, a enzima é selecionada do grupo consistindo de NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1) e NADPH citocromo P450 redutase (P450R). Em uma modalidade em particular, a enzima é NQO1 e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona sozinha. Em outra modalidade em particular, a enzima é NQO1 e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona em combinação com outro tratamento. Em outra modalidade em particular a enzima é a P450R e o tratamento compreende a administração sozinha de uma droga biorredutora à base de quinona. Em ainda outra modalidade em particular a enzima é P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona em combinação com outro tratamento. Em uma nova modalidade de

acordo com a presente invenção, a enzima é a NQO1 e a P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona sozinha. Em ainda outra modalidade, a enzima é a NQO1 e a P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona em combinação com outro tratamento.

Uma modalidade de acordo com a presente invenção compreende também a determinação dos níveis de hipoxia dentro de um tumor e a escolha de um tratamento à base de pelo menos um nível de enzima e nível de hipoxia. Em uma modalidade específica, o nível de hipoxia é determinado medindo transportador 1 de glicose (Glut 1) e/ou anidrase carbônica IX (CAIX).

Uma modalidade em particular de acordo com a presente invenção inclui um método para tratar o câncer de bexiga compreendendo escolha de um tratamento baseado em uma medição selecionada do grupo consistindo de níveis de NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1), níveis de NADPH citocromo P450 redutase (P450R), e níveis do transportador 1 de glicose (Glut 1) em que o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona sozinha ou em combinação com outro tratamento. Em vários aspectos desta modalidade em particular: a medição pode ser da NQO1 ou da P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona sozinha; a medição pode ser da NQO1 ou da P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona em combinação com outro tratamento; a medição pode ser da NQO1 e da

P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona sozinha; a medição pode ser da NQOI e da P450R e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona em combinação com outro tratamento; ou a medição pode ser da NQO1, da P450R e do Glut 1 e o tratamento compreende a administração de uma droga biorredutora à base de quinona sozinha ou em combinação com outro tratamento.

Em uma modalidade de acordo com a presente invenção, a invenção inclui um método para tratar o câncer invasivo da bexiga compreendendo a determinação dos níveis de NQO1 e de Glut 1 dentro de um tumor; selecionar um tratamento de combinação incluindo uma droga biorredutora à base de quinona em combinação com outro tratamento em outra base porque o dito nível de NQO1 é mais baixo do que o dito nível de Glut-1 é mais alto do que seria observado se o tumor dito fosse superficial.

Em outra modalidade de acordo com a presente invenção, a invenção inclui um método de estratificar um paciente para uma terapia adequada do câncer de bexiga baseado a níveis de expressão de NQ01 e de Glut 1 dentro do tumor de bexiga do dito paciente compreendendo: a determinação dos níveis de expressão de NQ01 e de Glut 1 dentro do tumor de bexiga do dito paciente; e administrar uma droga biorredutora como único agente terapêutico se o dito paciente tiver o câncer de bexiga superficial com altos níveis de NQ01 ou administrar uma terapia combinada onde uma droga biorredutora é usada em combinação com a terapia radioativa ou outro a-

gente quimioterapêutico caso o dito paciente tenha câncer invasivo da bexiga com níveis baixo de NQ01 e alta de Glut 1.

Em modalidades em particular de acordo com a presente invenção, outro tratamento é a radioterapia e/ou a administração de pelo menos um agente quimioterapêutico.

Em várias modalidades, a droga biorredutora à base de quinona especialmente útil será selecionada do grupo consistindo de mitomicina C, o EO9 derivado da indolequinona, aziridinil benzoquinona (RH1), e combinações dos mesmos.

A presente invenção também inclui preparações farmacêuticas. Especificamente, uma modalidade de acordo com a presente invenção inclui uma preparação farmacêutica compreendendo EO9 em uma solução com uma concentração de propileno glicol (PG) selecionada do grupo consistindo de aproximadamente 30 % vol/vol de PG, aproximadamente 20 % vol/vol de PG, e aproximadamente 10 % vol/vol de PG. As concentrações de EO9 podem estar presentes em uma faixa de variação de aproximadamente 300 µM a aproximadamente 400 µM. Em uma modalidade específica, a preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 µM de EO9.

As preparações farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem compreender também $NaHCO_3$, EDTA, manitol e água. Em uma modalidade, a preparação compreende de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 120 mg/mL de $NaHCO_3$ em uma modalidade específica, a preparação compreende aproximadamente 100 mg/mL ou aproximadamente 100,25 mg/mL de $NaHCO_3$. Em outra modalidade específica a preparação compre-

ende aproximadamente 50 mg/mL de $NaHCO_3$ ou aproximadamente 50,125 mg/mL de $NaHCO_3$. Em outra modalidade, a preparação compreende de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 3,0 mg/mL de manitol. Em uma modalidade específica, a preparação compreende aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol. Em outra modalidade específica a preparação compreende 1,25 mg/mL de manitol. Em outra modalidade específica, a preparação compreende aproximadamente 100 mg/mL de $NaHCO_3$, aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol e aproximadamente 0,1 mg/mL de EO9 em uma solução compreendendo EDTA, PG e água.

Uma modalidade de acordo com a presente invenção inclui uma preparação farmacêutica compreendendo EO9, $NaHCO_3$ e manitol em uma solução compreendendo PG, EDTA e água em que o PG está presente na solução em uma faixa de variação percentual selecionada do grupo consistindo de aproximadamente 6 % a aproximadamente 14 % vol/vol; de aproximadamente 16 % a aproximadamente 24 % vol/vol, e de aproximadamente 26 % a aproximadamente 34 % vol/vol. Em outra modalidade, o PG está presente na solução em um percentual selecionada do grupo consistindo de aproximadamente 10 % vol/vol, aproximadamente 20 % vol/vol, e aproximadamente 30 % vol/vol. Em outra modalidade, a preparação compreende uma solução com aproximadamente 347 μM de EO9 concentração e aproximadamente uma concentração de 10 % vol/vol de PG. Em ainda outra modalidade, a preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 μM de EO9 e uma concentração de aproximadamente 20 % vol/vol de PG. Em uma nova modalidade, a preparação compreende uma solução com uma concentração

de aproximadamente 347 μM EO9 e uma concentração de aproximadamente 30 % vol/vol de PG. Estas modalidades descritas da presente invenção podem compreender de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 120 mg/mL de NaHCO3 e em uma modalidade em particular compreenderá aproximadamente 100, aproximadamente 100,25 ou aproximadamente 50,125 mg/mL de $NaHCO_3$. Estas modalidades descritas da presente invenção também podem compreender de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 3,0 mg/mL de manitol e em uma modalidade em particular compreenderá aproximadamente 0,625 mg/mL ou aproximadamente 1,25 mg/mL de manitol.

Uma modalidade de acordo com a presente invenção pode incluir uma preparação farmacêutica em que a preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 μM de EO9, uma concentração de aproximadamente 10 % vol/vol de PG, aproximadamente 100,25 mg/mL de $NaHCO_3$ e aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol. Outra modalidade pode incluir uma preparação farmacêutica em que a preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 μM de EO9, uma concentração de aproximadamente 30 % vol/vol de PG, aproximadamente 100,25 mg/mL de $NaHCO_3$ e aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS.

A Figura 1 mostra a análise imunoistoquímica da NQO1, da P450R e do Glut-1 em três pacientes com carcinoma da célula transicional da bexiga.

A Figura 2 mostra o equipamento usado para estudar a penetração da droga através de camadas de múltiplas célu-

las.

A Figura 3 mostra uma representação esquemática de preparações da solução de droga.

A Figura 4 mostra um cromatograma da amostra em branco semeada com WV14 como um padrão interno.

A Figura 5 mostra cromatogramas do padrão EO9 na cultura de RPM1 1640.

A Figura 6 mostra cromatogramas de padrões de EO9 em 0,1 % de DMSO (6A); 30 % propileno glicol (PG; 6B); 20 % de PG (6C); e 10 % de PG (6D).

A Figura 7 mostra as curvas de calibração de EO9 em 0,1 % de DMSO e diversas concentrações de PG (30 %; 20 %; 10 %).

A Figura 8 mostra a penetração de EO9 em várias concentrações PG através de camadas de múltiplas células DLD-1.

A Figura 9 mostra seções retas representativas através de camadas de múltiplas células DLD-1 coradas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.

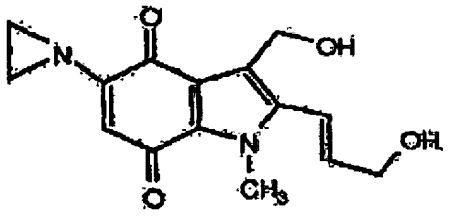
As drogas biorredutoras à base de quinona são pró-drogas que geram espécies citotóxicas após ativação enzimática. A enzima NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1; também chamada DT-diaforase (DTD)), uma enzima redutase com dois elétrons, desempenha um papel proeminente na ativação de drogas biorredutoras à base de quinona sob condições aeróbicas. As drogas biorredutoras à base de quinona são também citotóxicas sob condições hipóxicas incluindo células com baixa atividade NQO1. Enzimas de redução com um elétron, tal

como a Citocromo P450 redutase podem desempenhar um papel mais proeminente na ativação de drogas biorredutoras à base de quinona sob condições hipóxicas. Com base nos termos precedentes, os níveis dessas redutases e as condições hipóxicas podem indicar que a adequação de diferentes terapias de câncer incluindo a adequação de usar diversas drogas biorredutoras à base de quinona. A presente invenção assim avaliou os níveis das redutases descritas e das condições hipóxicas em diferentes graus e estágios do TCC.

As melhoras no tratamento do câncer de bexiga também podem ocorrer baseadas no fornecimento de preparações farmacêuticas compreendendo drogas biorredutoras à base de quinona com perfis de penetração variados. Por exemplo, as preparações farmacêuticas com perfis de penetração mais baixos seriam benéficas para usar tratando cânceres superficiais da bexiga porque a droga permaneceria mais próxima da superfície da bexiga onde o tratamento é mais necessário. De modo inverso, preparações farmacêuticas com perfis mais altos de penetração seriam benéficas o tratamento de cânceres de bexiga mais músculo invasivos porque a droga penetraria nas camadas mais profundas da bexiga onde o tratamento seria mais necessário naqueles casos. Tomado em conjunto, os vários aspectos da presente invenção fornecem avanços importantes no tratamento do câncer de bexiga permitindo a estruturação de tratamentos de cânceres com características específicas relativas ao perfil da doença em um indivíduo.

A apaziquona (prop. INN, USAN), também conhecida como EO9 ou NSC-382459 (3-hidroximetil-5-aziridinil-1-metil-

2-(1H-indol-4,7-diona)-propenol com a fórmula estrutural:



,

é um biorredutor totalmente sintético de alquilação da indoloquinona. Acredita-se que o mecanismo básico da ativação da EO9 seja semelhante àquele de outras indoloquinonas, implicando na redução por enzimas celulares que transferem um ou dois elétrons, formando a semiquinona e a hidroquinona, respectivamente. A oxidação da semiquinona sob condições aeróbicas resulta em um ciclo redox que pode causar a morte da célula pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em quebras da fita de DNA. A semiquinona / hidroquinona pode, particularmente sob condições hipóxicas, alquilar e reticular o DNA e outras macromoléculas, causando a morte da célula. A EO9 é um exemplo não limitante da droga biorredutora à base de quinona que é adequada para uso com a presente invenção.

EXEMPLO 1.

I. Materiais e Métodos.

A. Tecidos Humanos.

Os espécimes fixados em formalina, embebidos em parafina de carcinomas de célula transicionais humanas da bexiga (n = 52) foram usados para este estudo depois de obter primeiro consentimento da pesquisa local e do comitê de ética (LREC) segundo as regulações do Conselho de Pesquisas Médicas. Todos os detalhes dos pacientes foram ocultados pa-

ra assegurar a confidencialidade e todos os experimentos foram executados conforme orientações estabelecidas pelo LREC. Os tumores usados para o estudo foram representativos de todos os graus (11 Grau 1; 26 Grau 2; 15 Grau 3) de ambos, superficiais (19 pTa; 19 pT1) e músculo invasivo (14 $\geq$ pT2) e estágios de TCC da bexiga humana. Todos os blocos de tumor foram usados para a construção de mirovetores de tecido (TMAs) e análise imunoistoquímica subseqüente.

B. Construção do mirovetor de tecido.

As construções de mirovetor de tecido (TMAs) foram estruturadas a partir dos blocos introduzidos de parafina para representar vários graus (G1-G3) e vários estágios (pTa, pT1, $\geq$ pT2) do TCC da bexiga humana. A construção do mirovetor de tecido (TMA) foi realizada usando um contrutor de microvetor da Beecher Instruments (Silver Spring, MD, USA) pela utilização de um método modificado de Bubendorf et al/. (11) que é incorporado aqui pela referência. Resumidamente, as seções de cada bloco de doador de parafina foram introduzidos na utilização corada por hematoxilina e eosina (H&E), examinado pela microscopia e uma área que contém o tecido de interesse foi marcada no bloco de cera. Os núcleos cilíndricos (600 μM) foram pinçados para biópsia destas áreas representativas e transferidos para um bloco recipiente. A amostragem de tecido usou quatro núcleos de cada bloco de tumor para fornecer dados representativos sobre cada bloco de origem. Um total de 108 amostras principais que representam 26 pacientes foi incluído por bloco de TMA e dois blocos de TMA foram construídos. As seções, com espessura de

5 µM, foram cortadas dos blocos recebedores de TMA e montados sobre lâmina de vidro usando um sistema de transferência de fita (Instrumedics, EUA). A coloração H&E para a verificação de histologia e integridade de mostra foi executada na primeira e a cada décima seção subseqüente cortada de cada bloco de mirovetor. A lâmina de TMA foi então submetida a análises de imunoistoquímica.

C. Anticorpos.

Os anticorpos usaram incluiu anticorpo monoclonal de rato contra NQO1 (fornecido pelos doutores Siegel e Ross, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA), um anticorpo policlonal de cabra específico para P450R (Santa Cruz Biotechnology, USA), anticorpo monoclonal de rato contra Ki67 (BD Biosciences, Reino Unido) e um anticorpo policlonal de coelho específico para o transportador 1 de glicose (GLUT-1 ; Dako, Reino Unido).

D. Imunoistoquímica.

A iminolocalização de NQO1, P450R, GLUT-1 e Ki67 foi avaliada por imunoistoquímica, como anteriormente descrito (9, 10, 12, 13) e entendido por aqueles com habilidade normal na técnica. Resumidamente, seguindo a recuperação de antígeno e o bloqueio da ligação de imunoglobulina não-específica, TMAs foram incubados com o anticorpo primário apropriado: incubado durante aproximadamente 60 minutos com o anticorpo anti-NQO1 diluído em 1:1 TBSTM (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, Tween 20 0,2 %, leite em pó sem gordura a 5 %); incubado durante aproximadamente 90 minutos para P450R diluído a 1:100 em PBS; incubado durante aproximadamente 90 mi-

nutos com o anticorpo anti-Glut-1 diluido a 1:25 em PBS; ou incubado durante a noite em 4°C com o anticorpo anti-Ki67 diluido a 1:100 em PBS. Os controles foram executados usando IgG normal em vez do anticorpo primário, a imunolocalização foi realizada usando o anticorpo secundário biotinilado apropriado (diluido a 1:200; Vector Labs., USA), seguido por amplificação de sinal usando um kit ABC Vectastain (Vector Labs., USA) e visualização com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Vector Labs., USA). As seções foram então contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratado, compensado e montado em montagem DPX (Sigma, Reino Unido).

E. Análise semiquantitativa da coloração imunoistoquímica.

A imunocoloração positiva foi marcada semi-quantitativamente por três observadores independentes. Tanto NQO1 como P450R foram localizados citoplasmaticamente dentro do tumor. Uma avaliação do compartimento epitelial de cada núcleo de tumor baseado na intensidade e na distribuição da mancha foi avaliada de 0 (não corado) até 4 (intensidade máxima de coloração). Uma intensidade de marcação média foi calculada para cada núcleo e cada tumor do TMA dos resultados dos observadores independentes. Os resultados foram comparados para qualquer relação e correlações a parâmetros clínicos patológicos.

O nível da positividade do Glut 1 em cada núcleo TMA foi analisado e destinou uma conta de 0 a 4 representante da percentagem aproximada de células de tumor que demonstram membrana se sujar (0 = não corado; 1 = 0-5 % positivos;

2 = 5 - 15 % positivos; 3 = 15-30 % positivos; 4 => 30 % positivos). Uma intensidade de coloração média foi calculada para cada núcleo e cada tumor do TMA dos resultados dos observadores independentes. Os resultados foram comparados para qualquer relação e correlações a parâmetros clínicos patológicos.

A percentagem de núcleos positivos Ki67 nas células de tumor foi calculada usando ampliação de 40x de cada núcleo e tumor, como informado por Santos et al. (13,14) que é incorporado aqui pela referência. Foi contado um total de 200 células por núcleo e 800 células por tumor e a positividade percentual foi calculada. A coloração foi realizada independentemente por dois observadores. Os resultados foram comparados para qualquer relação e correlações a parâmetros clínicos patológicos.

F. Análise Estatística.

A expressão de NQO1 e P450R foi comparada com os seguintes parâmetros clínicos patológicos: etapa de tumor, grau de tumor, hipoxia de tumor (expressão do Glut 1) e proliferação. A análise estatística foi empreendida usando o pacote de software SPSS, versão 11.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). No estudo de imunoistoquímica, como a expressão não é normalmente distribuída, os valores de expressão médios de cada categoria foram informados comFiguras médios com variações de interquartil. As diferenças entre variáveis independentes foram determinadas pelo teste Mann-Whitney U. Os valores de P menores que 0,05 nas análises de dupla cauda foram considerados significantes.

II. Resultados.

A. Relação entre os níveis de proteína NQO1, etapa e grau do tumor.

A NQO1 foi localizada citoplasmaticamente nos epitélios de tumores de bexiga de qualquer grau patológico e o estágio e expressão de NQO1 foi variado entre tumores (Figura 1, Tabela 1). Em muitos casos um modelo de expressão heterogêneo de NQO1 foi observado dentro do mesmo tumor, com áreas da expressão NQO1 alta e baixa dentro da mesma amostra (dados não mostrados). NQO1 foi expresso em tumores de todos os estágios patológicos (pTa, pT1, $\geq$ pT2) embora os níveis de expressão de NQO1 variassem entre vários estágios (Tabela 1). Uma diferença significante na expressão NQO1 foi observada entre tumores superficiais (pTa + pT1) e músculo tumores invasivos ($\geq$ pT2), com a expressão sendo significativamente inferior nos tumores músculo invasivos ($P = 0,02$). A relação inversa da expressão NQO1 ao tumor potencial invasivo é também reforçada pela diferença significante na expressão observada entre tumores não-invasivos (pTa) e invasivos (pT1 + $\geq$ pT2) ($P = 0,03$). Todos os graus patológicos do TCC exprimiram o NQO1 (Tabela 1). A expressão de NQO1 foi significativamente mais alta nos tumores de grau 2 em comparação com o grau 1 ou em comparação com o grau 3 (Tabela 1). Nenhuma diferença significante foi observada entre tumores altamente diferenciados (grau 1) e pobremente diferenciados (grau 3) (Tabela 1).

B. Relação entre expressão de proteína P450R e o estágio e o grau do tumor.

Todos os tumores exibiram níveis citoplasmaticamente detectáveis expressos e localizados de P450R. Em contraste com NQO1, a expressão de P450R foi geralmente uniforme dentro dos tumores. Immunostaining representativo é representado na Figura 1. P450R foi expresso em todas as estágios do TCC (Tabela 1). Os níveis de P450R foram significativamente mais altos nos tumores músculo invasivos (≥pT2) em comparação com superficial (pTa + pT1) tumores ($P < 0.01$). Em contraste com NQO1, a expressão de P450R mostra uma relação positiva à etapa de tumor crescente mas não se associa com o potencial invasivo do tumor, como é evidente da falta da diferença significante observada entre invasivo (pT1 + > pT2) e tumores não-invasivos (pTa) (Tabela 1). Todos os graus patológicos do TCC exprimiram o P450R (Tabela 1). Uma correlação positiva foi observada entre níveis P450R e grau de tumor crescente (Tabela 1).

C. Relação entre GIuM e etapa de tumor e grau.

A expressão da Glut 1 proteína foi heterogênea tanto dentro de espécimes de tumor individuais como entre amostras pacientes individuais. Immunostaining representativo e a sua relação com etapa de tumor e grau são apresentados na Figura 1 e Tabela 1 respectivamente. Glut 1 proteína foi expressa em todas as estágios e graus examinados embora os níveis da Glut 1 fossem significativamente mais altos em> pT2 tumores (quanto a tumores pTa, $P = 0.05$) e Grau 3 tumores (tanto quanto a Grau 1 [$P = 0.03$] como quanto a Grau 2 [$P < 0.01$] tumores). Além disso, as diferenças por meio de estatística significantes ($P = 0.02$) existem entre não-

invasivo (pTa) e invasivo (pT1 + > pT2) tumores que sugerem que a doença invasiva se associe com Glut mais alta 1 expressão de proteína e níveis conseqüentemente mais altos da hipoxia.

D. Relação entre Ki67, etapa de tumor, grau de tumor e enzimologia.

Os níveis de expressão do antígeno Ki67 foram usados como um indicador do tumor proliferative índice (Tabela 1). Como esperado, uma correlação significante foi observada entre grau de tumor crescente (reduzindo diferenciação) e índice de proliferação (P <0.01). Nenhuma relação foi observada entre proliferação de tumor e tumor potencial invasivo (pTa contra pT1 +> pT2). Ao contrário a proliferação de tumor foi significativamente mais alta nos tumores músculo invasivos (≥pT2) quanto a tumores superficiais (pTa + pT1 [P <0,01]) provavelmente em conseqüência da relação entre invasão de músculo e grau de tumor mais alto. De maneira interessante, uma relação significante foi observada entre o tumor proliferative índice e amba a A expressão do Glut 1 (P = 0.01) e expressão P450R (P <0.01), mas não expressão de NQO1.

Os resultados deste estudo demonstram que a expressão de proteína de enzimas-chave implicadas na ativação biorredutora de quinona baseou compostos e a presença da hipoxia como determinado pela Glut 1 níveis de proteína modifica com etapa e grau do TCC da bexiga. A observação mais notável é o fato que a expressão de proteína NQO1 diminui significativamente com o estágio do tumor crescente (Tabela

1). Quanto ao grau de tumor, há também evidência que os tumores G3 têm níveis mais baixos de NQO1 do que G2 (mas não G1) tumores. Estes achados são de acordo com estudos anteriormente publicados onde uma relação inversa entre NQO1 mRNA expressão e a etapa (15) de tumor crescente foi informada. De mesmo modo para a Glut 1, a expressão de proteína aumentada com o grau de tumor ($P = 0.03$ e <0.01 quando G1 e G2 foram comparados com tumores G3 respectivamente) e etapa de tumor ($P = 0.05$ quando os tumores pTa são em comparação com tumores > pT2) é compatível com relatórios prévios (16). Em contraste com relatórios anteriormente publicados que demonstram os níveis mais altos do P450R mRNA em superficial em comparação com TCC músculo invasivo (15), os níveis de proteína de P450R foram significativamente mais altos em músculo invasivo (> pT2 em comparação com pTa + pT1) doença neste estudo ($P <0.01$). Além disso, a expressão de proteína de P450R mostra uma correlação positiva com o grau de tumor crescente (reduzindo diferenciação) (Tabela 1). De maneira interessante, a expressão de P450R também demonstrou uma correlação positiva forte ao índice de proliferação ($P <0.01$), provavelmente como consequência de uma relação forte entre P450R, Ki67 e grau de tumor crescente (reduzindo diferenciação). No entanto, isto deve ser levado em consideração avaliando biorredutora terapia que implica P450R desde que se mostrou que o alto índice proliferative se relaciona à profecia pobre no câncer de bexiga (17,18). No sumário, a análise da expressão de proteína por imunoistoquímica sugere que a hipoxia, como demonstrado pela A expressão do Glut 1,

se relacione o estágio do tumor crescente, grau e invasão de tumor. Com referência à enzimologia de tumor, este estudo sugere que os níveis NQO1 significativamente diminuam como uma função do estágio do tumor crescente (e potencial invasivo) enquanto que os níveis P450R aumentam com grau de tumor e potencial invasivo.

Estes achados têm implicações significantes de estratégias terapêuticas potenciais usando drogas biorredutoras à base de quinona no tratamento do TCC da bexiga. Há evidência extensa em modelos pré-clínicos que indicam que a resposta de células a MMC, EO9 e RH1 depende não só a níveis NQO1 mas também ao nível da hipoxia de tumor. Quanto a MMC, o papel de NQO1 na determinação de resposta celular sob condições aeróbicas é controvertido mas sob condições hipóxicas, potentiation significante da atividade é visto só em células que têm baixo ou n. NQO1 de atividade (19). Em caso de EO9 e RH1, os resultados semelhantes foram obtidos sob condições de hipóxicas com potentiation marcado de atividade observada só em células com NQO1 baixo (20,21). Sob condições aeróbicas contudo, há uma boa correlação entre a atividade NQO1 e chemosensitivity sugestão que na presença de oxigênio, NQO1 desempenhe um papel proeminente na ativação de EO9 e RH1 (22,23). à base mecanicista para explicar esta observação não é clara (24) mas sob condições hipóxicas, um elétron redutases, tais como P450R assumem um papel mais influente no processo de ativação biorredutora (25). Baseado nestes achados, os compostos, tais como EO9 e RH1 visariam a fração aeróbicas de tumores ricos NQO1 (e assim ia MMC mas

até um menor ponto) ou a fração hipóxicas de tumores deficientes NQO1 que supõem que um elétron redutases, tal como P450R esteja presente. Em caso de tumores ricos NQO1, por isso, o uso de compostos, tais como EO9 e RH1 como os agentes únicos que visam a fração aeróbicas seriam apropriados. Para tumores deficientes NQO1 com uma fração hipóxicas significante, estes reagentes devem estar usados em combinação com a radioterapia ou outros agentes chemotherapeutic que visam a fração aeróbicas. Os resultados deste estudo sugerem que esta última estratégia possa ser eficaz em caso do TCC mais promovido da bexiga (isto é, $\geq$ pT2) ou doença mais agressiva (isto é. Grau 3 tumores) como estes tipicamente têm baixo a expressão de proteína de NQO1 (e a possivelmente maior expressão de P450R) e contêm áreas significantes da hipoxia. Neste contexto específico, ele tem o interesse em observar que os resultados encorajadores foram obtidos no câncer de músculo invasivo da bexiga usando quimioradioterapia (Mitomicina C mais 5 Fluorouracil em combinação com a radioterapia radical) embora a análise de NQO1 e marcadores de hipoxia não fosse incorporada no desenho deste estudo (26). No mais largo contexto, a manifestação nisto e outros estudos que tanto superficial como músculo bexiga invasiva TCC têm regiões significantes da hipoxia sugere que estes tumores sejam candidatos atraentes para avaliar outras drogas biorredutoras ou a hipoxia mediou a terapia.

Finalmente, os resultados deste estudo demonstraram que a expressão de proteína de enzimas-chave implicadas na ativação biorredutora de quinona baseou compostos e a

presença de modificações de hipoxia como uma função de etapa de tumor e grau em TCC da bexiga. Estes resultados sugerem que estes tumores (isto é>. o pT2 e os tumores G3) seria bons candidatos para regimes de chemo-radioterapia usando quinonas (p. ex. MMC, EO9 e RH1) para visar a fração hipóxicas em combinação com a radiação ou outro chemotherapeutics para visar a fração aeróbicas de células. Baseado nestas bases lógicas, e referindo-se atrás aFigura 1, caso um (pT2 G3) demonstra níveis baixo NQO1, alto P450R e alto Glut 1 e por isso seria um bom candidato para quimioradioterapia usando quinonas. O Caso B (pTa G1) tem alto NQ01, baixo P450R e a Glut moderada 1 e como tal devem responder bem à quimioterapia baseada de quinona. O Caso C (pTi G2) que tem NQO1 moderado, P450R moderado e Glut moderada 1 também seria predito para responder bem à quimioterapia baseada de quinona. Copiador de tumores de pacientes individuais destes marcadores permanece importante, particularmente em vista da heterogeneidade interpaciente marcada (particularmente com NQO1) que existe.

Como usado neste lugar, quando usar níveis de enzima para determinar um tratamento apropriado de um paciente, "alto" contra níveis "baixos" da enzima pode ser apurado comparando os níveis da enzima do interesse do tumor relevante a outros tumores do mesmo paciente, a tumores de outro paciente e/ou a linhas de célula de tumor padrão ou outra referência disponível aponta conhecido àqueles com habilidade normal na técnica. Assim, os níveis "altos" e "baixos" podem ser determinados por um médico de trato ou outro labo-

ratório, pesquisa ou pessoal de tratamento implicado no medir e/ou quantitating os níveis de enzima de tumor de um determinado paciente.

EXEMPLO 2.

I. Materiais e Métodos.

A. Aparelhagem e princípio geral do ensaio.

Como mostrado na Figura 2, o aparelho usado no experimento descrito compreendeu uma inserção trans poços (Co-adjuvante) introduzido em um poço de uma placa de cultura de 24 poços. A inserção tinha um colágeno cobriu a membrana na sua base e assim formou ambos uma barreira entre o topo e câmara de fundo bem como uma superfície aproximadamente na qual as células puderam se fixar e crescer. A linha de célula usada neste estudo foi células humanas de adenocarcinoma de cólon DLD-1 que foram selecionadas por causa da sua capacidade de formar ligações estreitas entre células que por meio disso formam 'uma barreira' contínua através da qual a droga deve atravessar. Para avaliar a penetração da droga, as drogas foram acrescentadas à câmara superior e a concentração da droga na câmara de fundo foi determinada durante diversos intervalos de tempo.

B. Condições de cultura de célula.

As células de DLD-1 eram rotineiramente mantidas no meio de 1640 RPMI complementado com o soro fetal de bezerro a 10 %, piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (50 UI/ml, 50 µg/ml) e armazenaram em tampão com o HEPES (25 mM).

As células de DLD-1 (2,5 x 10^5 em 200 µl do meio)

foram acrescentadas à câmara superior e permitidas assentar e se anexarem à membrana durante aproximadamente 3 horas em 37 °C em atmosfera enriquecida (a 5 %) de CO_2. Uma vez as células fixadas, o trans poço foi inserido em um poço de uma placa de 24 poços e 600 µl do meio foram acrescentados à câmara de fundo. O aparelho então foi incubado a 37 ^{0}C durante 4 dias com trocas de meios diárias de ambas as câmaras superior e inferior. Baseado em estudos prévios, a espessura da camada de múltiplas células depois de 4 dias da cultura é aproximadamente 50 µm. Para cada ensaio, 3 trans poços foram retirados para exame histológico e a determinação exata de espessura e da integridade (veja abaixo para detalhes).

C. Preparação de soluções de droga.

As seguintes soluções foram preparadas como descrito abaixo e resumidas na Figura 3.

1. Solução 1: EO9 (347 µM) em 0,1 % de DMSO

EO9 sólido foi dissolvido em DMSO de 100 % para fazer uma solução de estoque de 347 mm 10 ml da solução de estoque foram acrescentados em 10 ml do meio RPMI completo (fenol vermelho livre). Para prevenir uma precipitação possível de EO9, a adição da solução de estoque EO9 no meio foi com agitação contínua. A concentração final de EO9 foi 347 µM que é equivalente a 4 mg/40 ml.

2. Solução 2: EO9 (347 µM) em 10 % de PG.

Duzentos miligramas do bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) foram dissolvidos em 4 ml da solução de EDTA (0,5 mg/mL, que foi preparado fresco da solução de estoque de 0,5 ml, Sigma). A solução então foi mista com 6 ml PG solução (2

ml PG + 4 ml H_2O) criação de um volume final de 10 ml que contêm 20 % de PG. Esta solução foi acrescentada em 20 tubo universal ml que contém EO9 (2 mg), bicarbonato de sódio (5 mg) e manitol (12.5 mg). A solução foi incubada em 37°C com a sacudidela contínua até que o EO9 fosse completamente dissolvido (aproximadamente 5-6 horas). Então, a solução foi diluída 1:1 com a água para produzir 10 % de PG, solução.

3. Solução 3: EO9 (347 μM) em 20 % de PG.

Duzentos miligramas do bicarbonato de sódio (NaHCOs) foram dissolvidos em 4 ml da solução EDTA (0.5 mg/mL, que foi preparado fresco da solução de estoque de 0.5 m, Sigma). A solução então foi mista com 6 ml PG solução (4 ml PG + 2 ml H_2O) criação de um volume final de 10 ml que contêm PG de 40 %. Esta solução foi acrescentada em 20 tubo universal ml que contém EO9 (2 mg), bicarbonato de sódio (5 mg) e manitol (12,5 mg). A solução foi incubada em 37°C com a sacudidela contínua até que o EO9 fosse completamente dissolvido (aproximadamente 3-4 horas). Então, a solução foi diluída a 1:1 com água para produzir 20 % de PG, solução.

4. Solução 4: EO9 (347 μM) em PG de 30 %.

Duzentos miligramas do bicarbonato de sódio (NaHCOa) foram dissolvidos em 4 ml da solução EDTA (0,5 mg/mL, que foi preparado fresco da solução de estoque de 0,5 m, Sigma). A solução então foi mista com 6 ml PG (6 ml PG + 0 ml hbO) criação de um volume final de 10 ml que contêm PG de 60 %. Esta solução foi acrescentada em 20 tubo universal ml que contém EO9 (2 mg), bicarbonato de sódio (5 mg) e manitol (12,5 mg). A solução foi incubada em 37 °C com a sacudidela

contínua até que o EO9 fosse completamente dissolvido (aproximadamente 2 horas). Então, a solução foi diluída 1:1 com a água para produzir PG de 30 %, solução.

D. Administração de droga.

Em todas as partes de todos os procedimentos, do meio usados foram como descritos em cima exceto que do meio gratuitos vermelhos phenol foram usados (o fenol vermelho elui muito perto do EO9 nos cromatogramas). EO9 foi acrescentado à câmara superior em t=0 em um volume de 100 µl e a câmara de fundo conteve 600 µl de meios (constantemente agitado). Depois de uma incubação de 10 minutos em 37 ^{0}C, o transpoço foi retirado e colocado em um novo poço da placa de 24 poços que contém 600 µl de meios frescos. A solução de droga na câmara superior foi retirada e substituída com 100 µl da solução de droga fresca (isto é, a concentração na câmara superior foi mantida em uma concentração constante). Este procedimento inteiro foi repetido em intervalos de 10 minutos durante um período de tempo total de 1 hora.

E. Procedimentos de extração.

O EO9 foi imediatamente extraído usando cartuchos Isolute C18 SPE. Os cartuchos foram preparados com 1 ml de metanol seguido lavando-se em 1 ml água deionizada antes da adição de mostra (500 µl). Depois de uma nova lavagem em 1 ml água deionizada, o EO9 foi eluído em 300 µl de metanol. As amostras foram secas sob vácuo (na temperatura ambiente em evaporador rotativo) e guardadas em -20 °C até necessária para análise ou reconstituídas na fase móvel (veja abaixo) para análise imediata.

F. Análise de HPLC.

A análise cromatográfica de EO9 foi executada como descrito por Phillips et al. (British Journal of Cancer. 65(3):359-64, 1992) que é incorporado aqui pela referência. Resumidamente, uma coluna RPB Hichrom (25 cm x 4,6 mm DI, Hichrom Ltd, Reino Unido) foi usada para a separação. Foi usado um fotodiodo detector da Waters 996 (λi = 280nm) com o software Masslynx 3.4 (Micromass Ltd) para a análise espectral dos picos de interesse. A fase móvel compôs-se de 1M tampão de fosfato (1 %), metanol (42 %) e água de grau HPLC (57 %). A taxa de fluxo foi estabelecida em 1,2 $min.ml^{-1}$ utilização de um Waters Alliance 2690 (Milford, MA, USA) um sistema de cromatografia por bombeamento quaternário, que também incorpora uma auto-amostragem. O limite de detecção foi 10 ng/ml (34.7 nM).

G. Histologia.

Para cada experimento, 3 inserções de transpoço foram coletadas; 1 controle e 2 no fim do experimento. Cada transpoço foi fixado em formalina a 10 % durante uma hora antes de transferência para o etanol a 70 % e armazenamento durante a noite. Usando um bisturi limpo, as membranas foram cuidadosamente separadas da inserção plástica e processadas para a inserção na cera de parafina usando procedimentos padrão conhecidos àqueles com habilidade normal na técnica. Os espécimes foram seccionados (δμrn) pela utilização de um microtom rotativo Leitz, montado sobre laminas de vidro recobertas deproteínas e a utilização de coloração por hemotoxilina e eosina também usando procedimentos padrão conhecidos

àqueles com habilidade normal na técnica. A espessura da camada de múltiplas células foi medida usando uma gradícula ocular que foi calibrada usando um micrômetro de estágios. Cinco medições foram obtidas para cada seção e foram medidas 3 seções por amostra.

II. Resultados.

A. Cromatogramas representativos.

A Figura 4 mostra um cromatograma de uma amostra em branco semeada com o padrão interno WV14 (tempo de retenção = 11,059 minutos). O pico em 6,870 minutos é um pico de contaminação. A Figura 5 mostra padrões EO9 (1 µg/ml (Figura 5A) e 20ng/ml (Figura 5B)) no meio de cultura de 1640 RPMI. Como mostrado na Figura 5A, o EO9 e picos de WV14 elute em 8.029 minutos e 13.023 minutos respectivamente (o pico em 7.292 minutos está o pico de contaminação descrito em cima). Deve observar-se que os tempos de retenção podem mover-se devido a flutuações de temperatura para um laboratório mas que os tempos de retenção relativos devem permanecer constantes. Figura 5B indica o limite da detecção. A Figura 6 mostra cromatogramas de padrões EO9 em 0,1 % de DMSO (Figura 6A); PG de 30 % (Figura 6B); 20 % de PG (Figura 6C); e 10 % de PG (Figura 6o).

B. Curvas de calibração.

As curvas de calibração foram construídas para cada preparação EO9 e os resultados são apresentados na Figura 7. As curvas de calibração foram diferenças reprodutíveis e sutis na inclinação de cada curva de calibração que foram observados como ilustrado na Figura 7. As razões das dife-

renças são pouco nítidas, mas podem refletir diferenças leves na eficiência de extração entre as preparações diferentes. As eficiências de extração de EO9 em 0,1 % de DMSO, 10 % de PG, 20 % de PG e PG de 30 % foram 92,3 %, 81,7 %, 79,9 % e 81,1 % respectivamente. Por causa desta variação, as curvas de calibração foram geradas para cada experimento conduzido. Nenhum produto de esgotamento óbvio foi visível em nenhum dos cromatogramas.

C. Penetração da Droga.

Como pode ser visto na Figura 8, como a concentração de aumentos de PG, a taxa de penetração de camada de múltiplas células de reduções de EO9. Quanto a EO9 em 0,1 % de DMSO, a cinética é linear que é como esperado quando a concentração na câmara superior é mantida em um valor mais ou menos constante. Nas duas concentrações mais altas de PG testado, ele vale a pena observar que a cinética é não exatamente linear - há um aumento progressivo na taxa como aumentos de tempo. Este efeito provavelmente reflete as modificações na espessura da camada de múltiplas células induzida por PG (ver Figura 9). Nenhum metabólito óbvio ou os produtos de esgotamento foram observados em nenhum dos pontos de tempo avaliados.

A Figura 9 mostra que os resultados da análise histológica empreendida para examinar a penetração de EO9 através de camadas de múltiplas células DLD-1. A espessura de seções tratadas de não-droga foi 56,01 ± 3,63 μM. Depois de uma hora do tratamento com EO9 em 0,1 % de DMSO, a espessura da camada de múltiplas células não foi significativa-

mente diferente de espécimes tratados de não-droga (58,80 ± 2,50 µM). Seguinte tratamento com EO9 em PG de 30 % contudo, a espessura da camada de múltiplas células reduziu significativamente a 29,01 ± 1,78 µM. Lá também foram marcados por modificações morfológicas na aparência dentro da camada, o mais óbvio do qual foi a aparência 'de intervalos' ou 'canais' na própria camada. Uma observação feita em todas as partes de experimentos usando EO9 em PG consistiu em que a câmara superior conteve mais fluido do que esperado. Por exemplo, depois de uma 10 incubação de minuto com EO9 em PG em 30 %, 20 % e 10 %, o volume recuperou-se da câmara superior foi 106 ± 3, 107 ± 3 e 105 ± 2 µl respectivamente (depois que uma exposição de hora a EO9 em 0,1 % de DMSO, o volume recuperado foi 98 + 2 µl). Deve realçar-se que estes volumes são só aproximações (sendo baseado no que pode ser recuperado usando uma pipeta de Gilson) mas eles realmente indicam que o volume de meios na câmara superior se modifica quando EO9 dissolvido em formulações PG (especialmente em PG de 30 %) está usado. É também notável que os quadros histological mostram que as células estão no contato DTDdo com a membrana de cave em controles e EO9 (0,1 % de DMSO) tratou espécimes mas para camadas imulticell tratou com EO9 em PG 30%, há uma fenda pequena mas distinta entre a camada de múltiplas células e a própria membrana.

REFERÊNCIAS.

1. Cancer Research UK, *Bladder cancer* - UK. London, 2002.

2. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, et al. *The ef-*

fect of intravesical mitomicina C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. J Urol 1996;155:1233-8.

3. Sartorelli AC, Hodnick WF, Belcourt MF, et al. *Mitomicina C: a prototype biorredutora agent.* Oncol Res 1994;6:501 -8.

4. Ross D, Beall HD, Siegel D, Traver RD, Gustafson DL. *Enzymology of biorredutora drug activation.* Br J Cancer 1996;Suppl 27:S1 -8.

5. Wardman P, Dennis MF, Everett SA, Patel KB, Stratford MR, Tracy M. *Radicals from one-electron reduction of nitro compounds, aromatic N-oxides and quinonas: the kinetic basis for hypoxia-selective, biorredutora drugs.* Biochem Soc Symp 1995;61 :171-94.

6. Workman P, Stratford IJ. *The experimental development of biorredutora drugs and their role in cancer therapy.* Cancer Met Rev 1993; 12:73-82.

7. Puri R, Basu S, Loadman P, et al. *Phase I clinical evaluation of intravesical EOquin (EO9) against superficial bladder cancer: Preliminary results.* Clinical Cancer Res 2003;9:6248S-9S.

8. Danson S, Ward TH, Butler J, Ranson M. *DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs.* Cancer Treat Rev 2004;30:437-49.

9. Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, Wilson GD. *GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON.* Br J Cancer 2003;89:1290- 7.

10. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, et al. *GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazol binding,* lnt J Cancer 2003;104:85-91.

11. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. *Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies.* J Pathol 2001 ;195: 72-9.

12. Basu S, Brown JE, Flannigan GM, et al. *lmmunohistochemical analysis of NAD(P)H:quinona oxirredutase and NADPH citocromo P450 redutase in human superficial bladder tumors: relationship between tumor enzymology and clinical outcome following intravesical mitomicina C therapy,* lnt J Cancer 2004; 109:703-9.

13. Santos L, Amaro T, Costa C, et al. *Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification,* lnt J Cancer 2003; 105: 267-72.

14. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, et al. *Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder.* Eur J Surg Oncol 2003;29:74-80.

15. Li D, Gan Y, Wientjes MG, Badalament RA, Au JL. *Distribution of DT- diaphorase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: citocromo p450 oxirredutase in bladder tissues and tumors.* J Urol 2001 ;166:2500-5.

16. Chang S, Lee S, Lee C, Kim Jl, Kim Y. *Expression of the human erythrocyte glucose transporter in transi-*

tional cell carcinoma of the bladder. Urology 2000;55:448-52.

17. Blanchet PDS, Eschwege P, Viellefond A, et al. *Prospective evaluation of Ki- 67 labeling in predicting the recurrence and progression of superficial bladder transitional cell carcinoma.* Eur Urology 2001 ;40:169-75.

18. Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. *MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors.* Cancer 2000;88:2598-605.

19. Plumb JA, Workman P. *Unusually marked hipóxicas sensitization to indoloquinona EO9 and mitomicina C in a human colon-tumor cell line that lacks DT-diaphorase activity,* lnt J Cancer 1994;56:134-9.

20. Plumb JA, Gerritsen M, Workman P. *DT-diaphorase protects cells from the hipóxicas citotóxicasity of indoloquinona EO9.* Br J Cancer 1994;70:1136-43.

21. Kim JY, Patterson AV, Stratford IJ, Hendry JH. *The importance of DT-diaphorase and hypoxia in the citotóxicasity of RH1 in human breast and non- small cell lung cancer cell lines.* Anticancer Drugs 2004; 15:71 -7.

22. Fitzsimmons SA, Workman P, Grever M, Paull K, Camalier R, Lewis AD. *Redutase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity ta Mitomicina C and EO9.* J Natl Cancer Inst 1996;88:259-69.

23. Dehn DL, Winski SL, Ross D. *Development of a*

new isogenic cell-xenograft system for evaluation of NAD(P)H:quinona oxirredutase-directed antitumor quinonas: evaluation of the activity of RH1. Clinical Cancer Res 2004;10:3147-55.

24. Workman P. Enzyme-directed biorredutora drug development revisited: a commentary on recent progress and future prospects with emphasis on quinona anticancer agents and quinona metabolizing enzymes, particularly DT-diaphorase. Oncol Res 1994 ;6:461-75.

25. Belcourt MF, Hodnick WF, Rockwell S, Sartorelli AC. *Differential toxicity of mitomicina C and porfiromycin to aeróbicas and hipóxicas Chinese hamster ovary cells overexpressing human NADPH citocromo c (P-450) redutase.* Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:456-60.

26. Hussain SA, Stocken DD, Peake DR, et al. *Long-term results of a phase Il study of synchronous quimioradioterapia in advanced muscle invasive bladder cancer.* Br J Cancer 2004, "90:2106-11. Tabela 1.

A expressão de proteína NQO1, P450R, FARTA 1 e KÏ67 em TCC humano da bexiga.

Os dados de NQO1, P450R e GLUT 1 são apresentados como a conta mediana (± variação interquaartil) de dois observadores. Os dados do índice de proliferação são apresentados como avaliação média ±SE de dois observadores. Os espécimes foram taxados entre 0 e 4 para NQO1, P450R e GLUT 1 e o índice de proliferação foi calculado como positividade % de Ki67 tal como descrito em "Materiais e Métodos".

	Núm de amostras	Expressão média NQO1 (± inter quartil)	Expressão média P450R (± inter quartil)	Expressão média GLUT-1 (± inter quartil)	Prolife-ração % (Ki67 posi-tivo) (±SE)
pT_a	19	2,50 (1,14-3,20)	3,20 (2,58-3,83)	2,00 (1,30-3,80)	16,75±2,8
pT_1	19	1,88(0,33-3,00)	2,96(2,33-3,67)	3,38(2,75-3,88)	13,88±2,2
pT_2	14	0,17(0,00-1,67)	3,89(3,75-3,92)	3,88(2,67-4,00)	24,59±4,43
G1	11	1,00(0,00-1,10)	2,79(2,17-2,92)	2,38(2,00-3,25)	9,72+2,64
G2	26	2,72(1,83-3,20)	3,35(2,75-3,83)	2,83(1,75-3,75)	14,59±1,72
G3	15	0,33(0,00-1,85)	3,83(3,31-3,92)	4,00(3,63-4,00)	30,47±3,71
Não in-vasivo[a]	19	2,50(1,14-3,20)	3,20(2,58-3,83)	2,00(1,31-3,67)	17,51±2,83
Invasivo[b]	33	1,67(0,00-2,52)	3,67(2,92-3,89)	3,50(2,71-4,00)	19,41±2,86
superfi-cial[c]	38	2,00(1,08-3,17)	3,10(2,33-3,78)	2,83(1,83-3,83)	15,69±1,79
Músculo invasivo[d]	14	0,17(0,00-1,67)	3,89(3,75-3,92)	3,88(2,67-4,00)	24,59±4,43

Os índices a, b, c e d significam os estágios tumorais pTa; (pT1 +pT2); (pTa + pT1) e pT2 respectivamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Preparação farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreendendo a EO9 em uma solução com uma concentração de propileno glicol (PG) selecionada do grupo consistindo de aproximadamente 30 % vol/vol de PG, aproximadamente 20 % vol/vol de PG, e aproximadamente 10 % vol/vol de PG.

2. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 300 μM a aproximadamente 400 μM de EO9.

3. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 μM de EO9.

4. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende também $NaHCO_3$, EDTA, manitol e água.

5. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 120 mg/mL de $NaHCOO_3$.

6. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 100 mg/ml de $NaHCO_3$.

7. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 50 mg/mL de $NaHCO_3$.

8. Preparação farmacêutica, de acordo com a rei-

vindicação 4, **CARACTERIZADA**, pelo fato de que a dita preparação compreende de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 3,0 mg/mL de manitol.

9. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol.

10. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 1,25 mg/mL de manitol.

11. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 100 mg/mL de $NaHCO_3$, aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol, e aproximadamente 0,1 mg/mL de EO9 em uma solução compreendendo EDTA, PG e água.

12. Preparação farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreendendo EO9, $NaHCO_3$ e manitol em uma solução compreendendo PG, EDTA e água em que o dito PG está presente na dita solução em um faixa de variação percentual selecionada do grupo consistindo de aproximadamente 6 % a aproximadamente 14 % vol/vol; de aproximadamente 16 % a aproximadamente 24 % vol/vol, e de aproximadamente 26 % a aproximadamente 34 % vol/vol.

13. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito PG está presente na dita solução em um percentual selecionado do grupo consistindo de aproximadamente 10 % vol/vol, de aproximadamente 20 % vol/vol, e de aproximadamente 30 % vol/vol.

14. Preparação farmacêutica, de acordo com a rei-

ração compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 µM de EO9 e uma concentração de aproximadamente 10 % vol/vol de PG.

15. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 µM de EO9 e uma concentração de aproximadamente 20 % vol/vol de PG.

16. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 µM de EO9 e uma concentração de aproximadamente 30 % vol/vol de PG.

17. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 120 mg/ml de $NaHCO_3$.

18. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 100 mg/mL de $NaHCO_3$.

19. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 50 mg/mL de $NaHCO_3$.

20. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 3,0 mg/mL de manitol.

21. Preparação farmacêutica, de acordo com a rei-

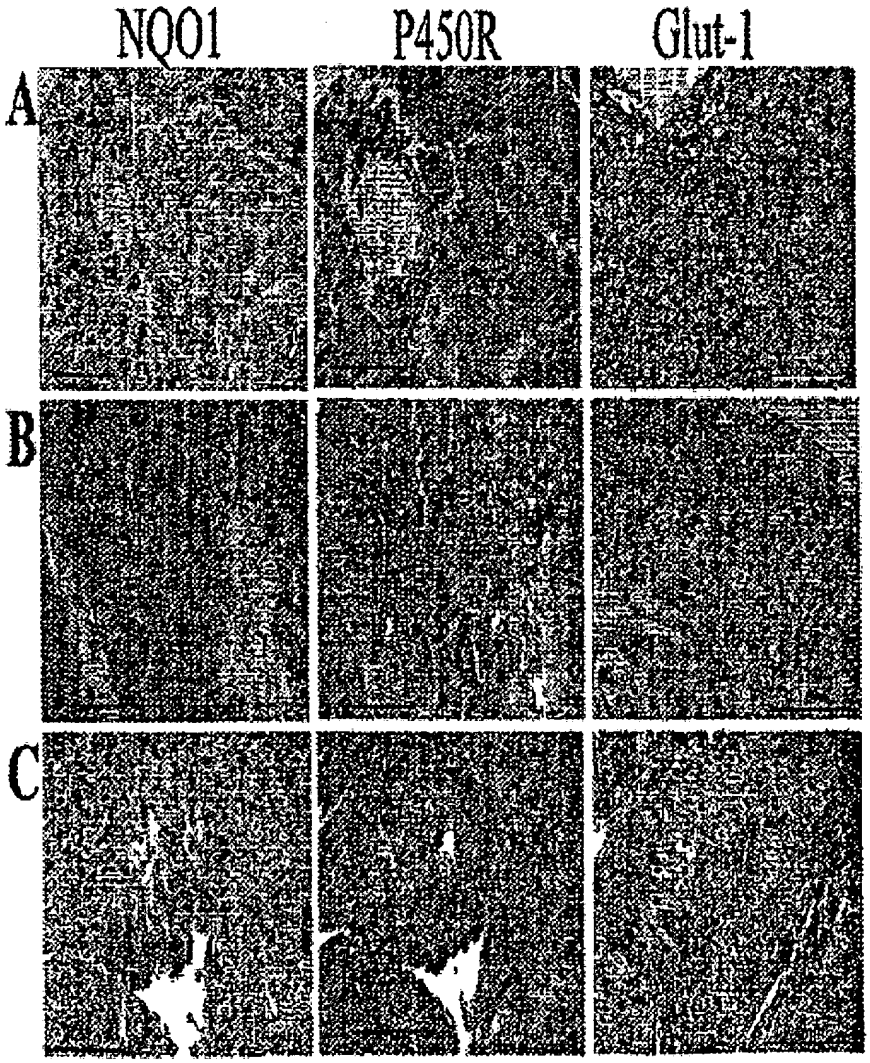
vindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol.

22. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende aproximadamente 1,25 mg/mL de manitol.

23. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 µM de EO9, uma concentração de aproximadamente 10 % vol/vol de PG, aproximadamente 100,25 mg/mL de $NaHCO_3$ e aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol.

24. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita preparação compreende uma solução com uma concentração de aproximadamente 347 µM de EO9, uma concentração de aproximadamente 30 % vol/vol de PG, aproximadamente 100,25 mg/mL de $NaHCO_3$ e aproximadamente 0,625 mg/mL de manitol.

FIG. 1



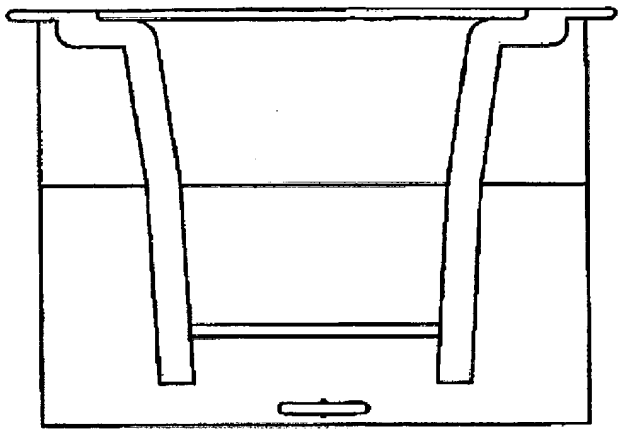


FIG. 2

0.5mg/ml EDTA 4 ml } A
$NaHCO_3$ 200mg }

1,2-Propilgcol (PG) 2,4 ou 6 ml } B
H_2O respectiv. 4,2 ou 0 ml }

EO9 2 mg } C
Manitol 12.5 mg
NaHCO3 5 mg }

} D **Misturar a 37°C por 2 a 6 h**

Mistura D + WFI 1:1 ⟹ **Pronto para uso**

FIG. 3

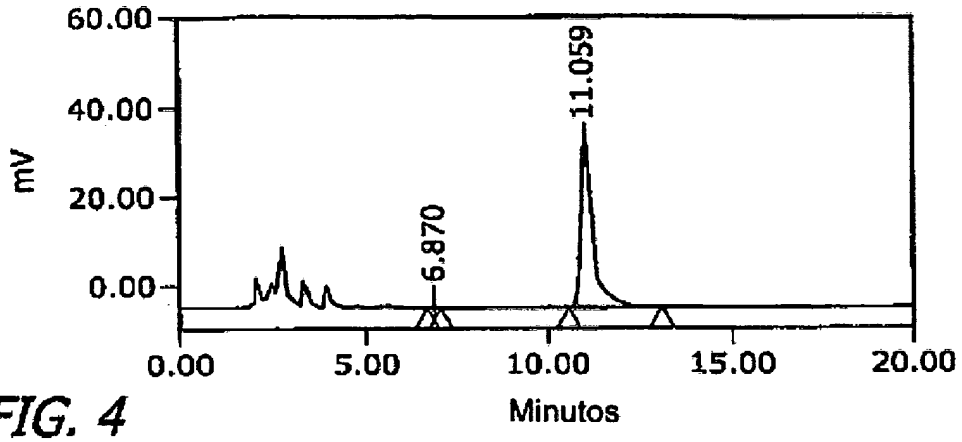


FIG. 4

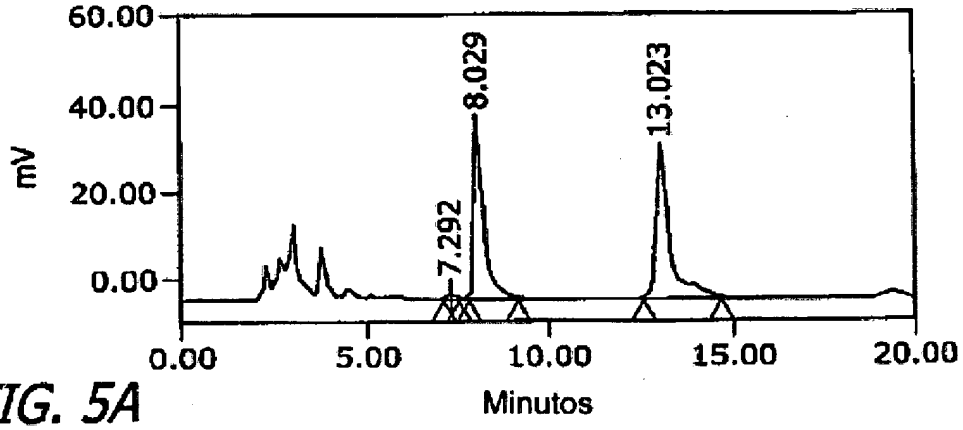


FIG. 5A

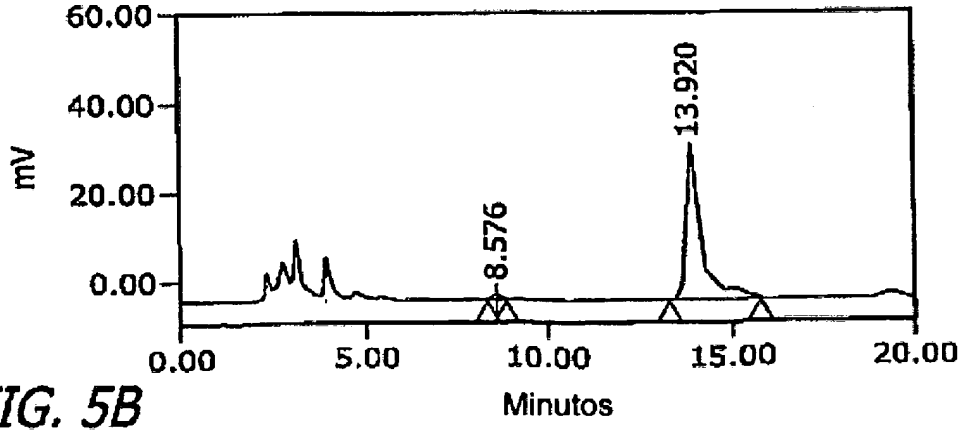


FIG. 5B

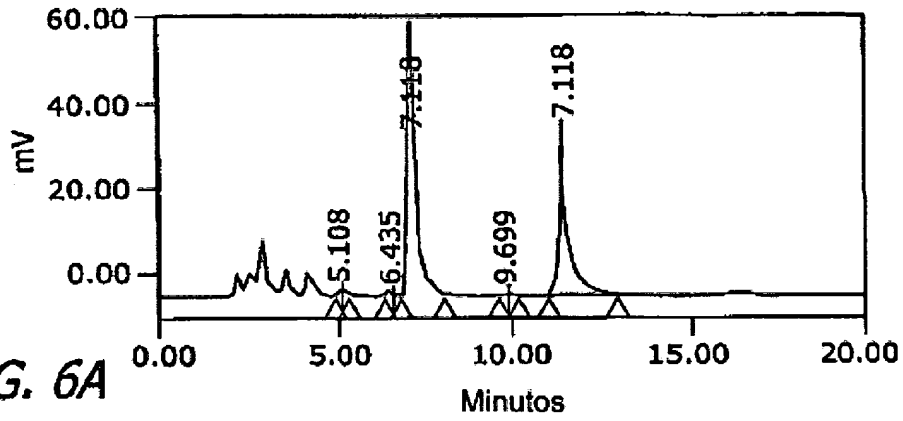


FIG. 6A

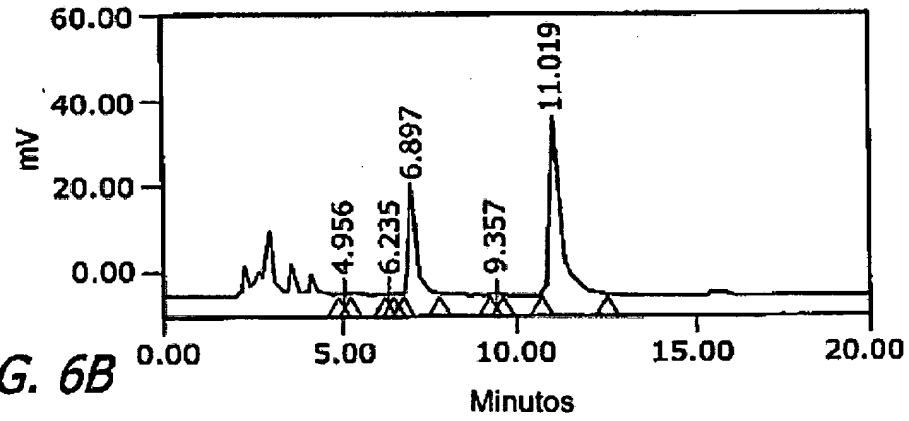


FIG. 6B

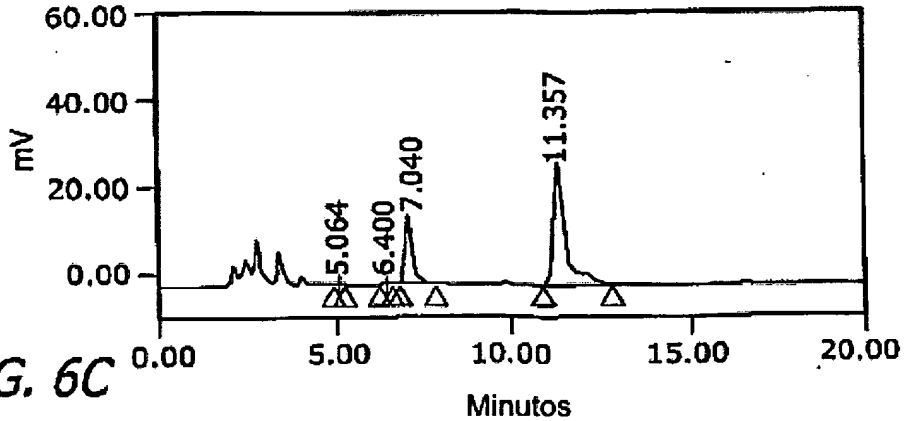


FIG. 6C

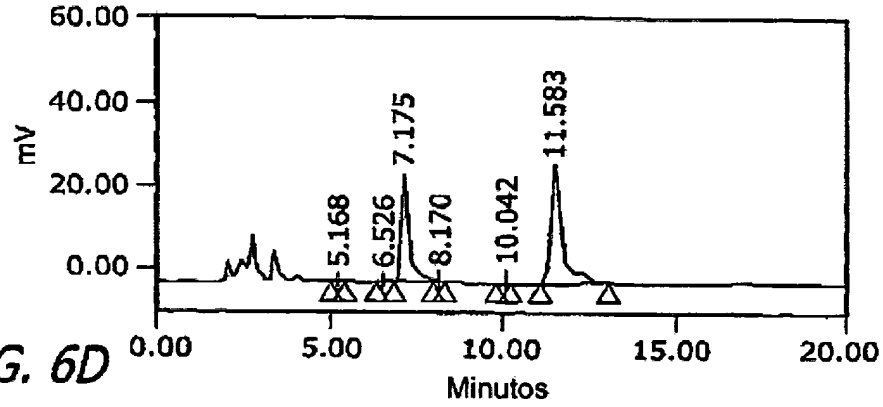

60.00
40.00
20.00
0.00
mV
5.168
6.526
7.175
8.170
10.042
11.583
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
Minutos

FIG. 6D

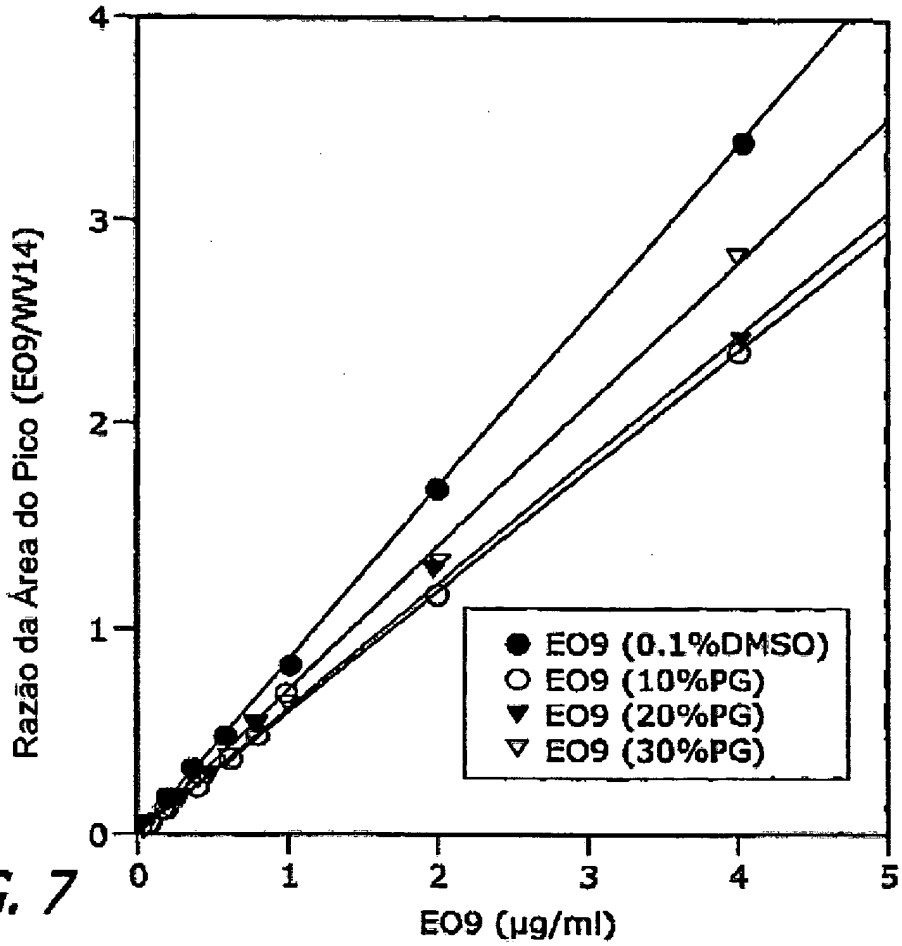

Razão da Área do Pico (EO9/WV14)
EO9 (µg/ml)
EO9 (0.1%DMSO)
EO9 (10%PG)
EO9 (20%PG)
EO9 (30%PG)
0
1
2
3
4
5

FIG. 7

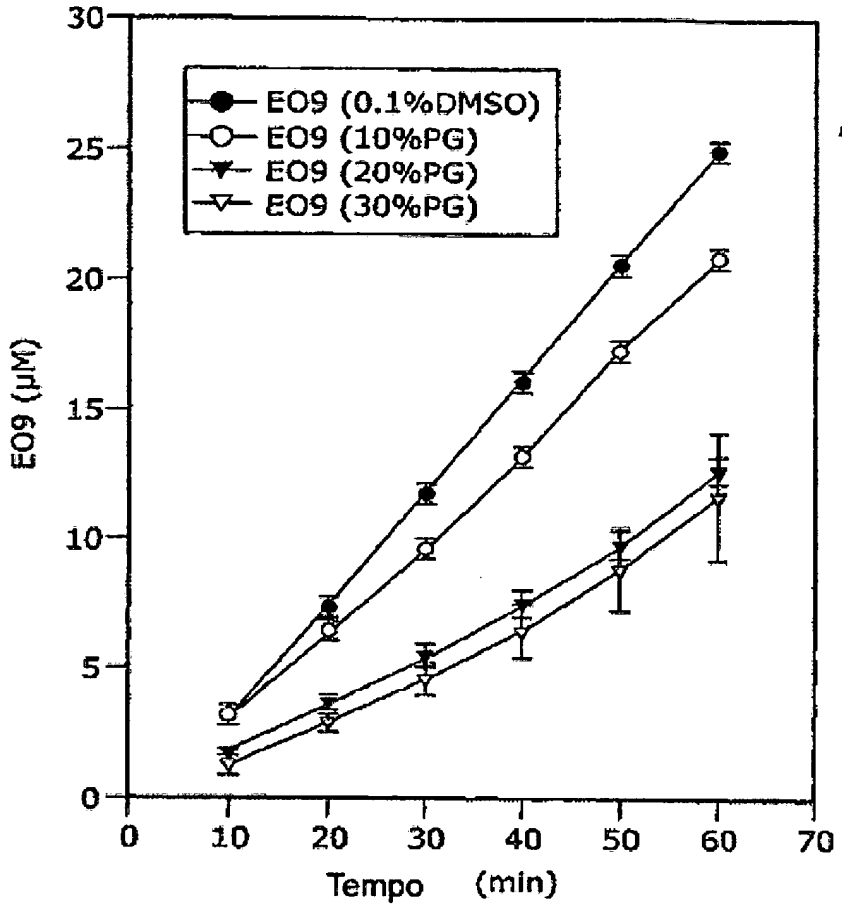
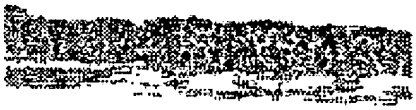
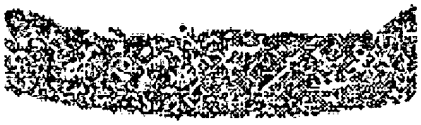


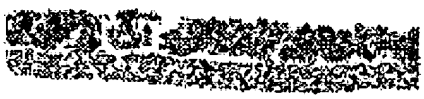
FIG. 8



Controle não tratado com drogas
Espessura de MCL = 56.01 ± 3.63 μm



MCL um hora apos tratamento com EO9 em 0,1 % de DMSO: Espessura de MCL = 58.80 ± 2.50 μm



MCL uma hora apóso tratamento com EO9 em 30 % de PG: Espessura de MCL = 29.01 ± 1.78 μm

FIG. 9

PI0707563-4

RESUMO

"TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA UTILIZANDO EO9 E PROPILENO GLICOL"

São divulgados aqui vários tratamentos para o câncer da bexiga e os métodos. A presente divulgação pode tirar vantagem de concentrações de propileno glicol e/ou NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1), citocromo P450 oxirredutase (P450R) e o transportador 1 de glicose (Glut 1) e da expressão de proteínas na célula transicional humana do carcinoma de bexiga para oferecer tratamentos de câncer de bexiga individualmente direcionados.