

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

(21) **PI0710564-9 A2**

(22) Data de Depósito: 23/04/2007
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/765 2006.01
A61K 31/785 2006.01
A61P 35/00 2006.01

(54) Título: **AGENTES ANTI-CÂNCER A BASE DE POLÍMERO**

(30) Prioridade Unionista: 24/04/2006 US 60/794,089

(73) Titular(es): Bruce Medical AB

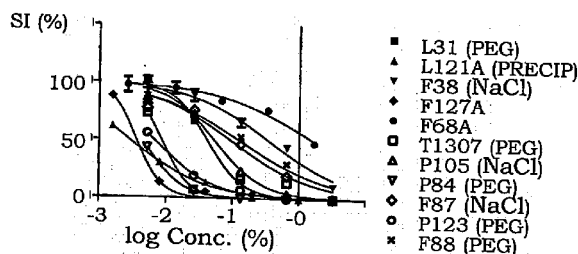
(72) Inventor(es): Bruce, Ingrid, Bruce, Lars

(74) Procurador(es): Magnus Aspeby e Claudio Szabas

(86) Pedido Internacional: PCT SE2007000392 de 23/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/123468de
01/11/2007

(57) Resumo: AGENTES ANTI-CÂNCER A BASE DE POLÍMERO. A presente invenção refere-se ao uso de copolímeros em bloco anfífilos para o tratamento e prevenção de câncer, e em particular pela redução da taxa de proliferação de células cancerígenas. Os copolímeros em bloco preferidos compreendem uma cadeia hidrofóbica central, preferivelmente uma cadeia de óxido de polipropileno, à qual pelo menos duas cadeias laterais hidrofílicas, preferivelmente cadeias de óxido de polietileno, estão conectadas.



AGENTES ANTI-CÂNCER A BASE DE POLÍMERO**CAMPO TÉCNICO**

A presente invenção refere-se genericamente ao
5 tratamento de câncer, e em particular ao uso de agentes
anti-câncer a base de polímero em tal tratamento de câncer.

ANTECEDENTES

Câncer é uma classe de doenças caracterizada por
divisão celular descontrolada e pela capacidade destas
10 células se espalharem, ou por crescimento direto em tecido
adjacente por invasão, ou por implante em locais distantes
no interior do corpo por metástase.

Atualmente, o câncer é uma das causas principais de
morte em humanos e o número de indivíduos afetados aumenta
15 a cada ano. Embora os diferentes métodos de tratamento
para câncer, por exemplo, quimioterapia, terapia endócrina,
radioterapia e cirurgia, tenham melhorado tremendamente nas
últimas décadas, estão longe de serem perfeitos em termos
de resultados para diferentes tipos de câncer.
20 Adicionalmente, vários dos tratamentos conhecidos de câncer
são frustrados pelas desvantagens dos altos custos do
tratamento, efeitos colaterais e sofrimento do paciente e
ineficiência relativa. Por estas razões, pesquisas
extensivas são conduzidas para se encontrar uma alternativa
25 ou formas complementares do tratamento de câncer.

O documento [1] descreve o uso de laxantes osmóticos
não fermentados como agentes ativos para a preparação de um
medicamento para o tratamento de cânceres do cólon e/ou
reto. Um exemplo de tal laxante é o PLURONIC® F68
30 disponibilizado pela BASF Corporation. Estes compostos

apresentam propriedades laxantes e gelificantes. Os compostos atraem e retêm água no interior do cólon devido às suas propriedades físico-químicas, e são capazes de aumentar a excreção fecal sem fibras. Acredita-se que as

5 propriedades laxantes, não fermentadas, osmóticas e de retenção de água, apresentam um efeito protetor em relação a dois tipos específicos de câncer, câncer de cólon e reto.

O documento [2] discute a capacidade de células tumorais em circulação de se desenvolverem em metástase,

10 onde esta capacidade baseia-se em uma aderência fisiológica inerente ao endotélio e na formação de um micro-coágulo. É descrito que substâncias que interferem com o processo de coagulação poderiam ser utilizadas na prevenção de metástase tumoral. As substâncias sugeridas

15 incluem heparina, warfarina sódica e PLURONIC® F68. Estas substâncias podem ser utilizadas em conexão com cirurgia para a prevenção de metástase secundária na manipulação cirúrgica do tumor.

SUMÁRIO

20 A presente invenção supera estas e outras desvantagens dos dispositivos do estado da técnica.

É um objetivo genérico da presente invenção prover um medicamento a base de polímero que pode ser utilizada para o tratamento ou prevenção de câncer.

25 É um outro objetivo da invenção prover um medicamento a base de polímero que reduz a proliferação de células cancerígenas.

Estes e outros objetivos são alcançados pela invenção conforme definida nas reivindicações anexas.

Em resumo, a presente invenção envolve a utilização do efeito anti-câncer inesperado de copolímeros em bloco anfifílicos. Estes copolímeros são agentes quimioterápicos efetivos contra uma diversidade de tipos de câncer e apresentam um efeito de redução da taxa de proliferação em células cancerígenas.

Os copolímeros em bloco anfifílicos da presente invenção preferivelmente compreendem uma cadeia polimérica hidrofóbica conectada a pelo menos duas cadeias laterais hidrofílicas. A cadeia polimérica hidrofóbica é preferivelmente uma cadeia central apresentando uma primeira extremidade conectada a pelo menos uma, preferivelmente uma ou duas, cadeia lateral hidrofílica e apresentando uma segunda extremidade conectada a pelo menos uma, preferivelmente uma ou duas, cadeia lateral hidrofílica.

Copolímeros em bloco anfifílicos preferidos são aqueles apresentando a estrutura (I):



Desta forma, copolímeros com uma cadeia polimérica central de óxido de propileno flanqueada por cadeias laterais de óxido de etileno são preferidos. Adicionalmente, n é preferivelmente igual a p. Tais copolímeros são disponibilizados sob a marca PLURONIC[®] pela BASF Corporation.

Copolímeros preferidos tais como PLURONIC[®] da invenção são aqueles que apresentam um teor médio de óxido de etileno de pelo menos 40% em peso e preferivelmente um

teor médio de óxido de etileno abaixo de 80% em peso. O teor de óxido de propileno médio do copolímero em bloco anfifílico é preferivelmente de pelo menos 2000 g/mol, mais preferivelmente de pelo menos 3000 g/mol, tal como cerca de 5 4000 ± 500 g/mol. Um exemplo de um copolímero preferido é o PLURONIC[®] F127 apresentando um peso molecular médio de 12600 g/mol, um teor médio de óxido de etileno de 73,3 ± 1,7% e um ponto de fusão de 56°C.

Os inventores descobriram surpreendentemente que 10 estes copolímeros apresentam efeito anti-câncer em termos de redução ou inibição da proliferação celular ou taxa de crescimento das células cancerígenas e de redução da síntese de DNA das células cancerígenas. Este efeito 15 surpreendente pode ser devido parcialmente ao efeito da ligação dos copolímeros às membranas celulares e bloqueio da ligação dos diferentes fatores de crescimento aos seus respectivos receptores na membrana.

A composição farmacêutica da invenção preferivelmente compreende um único copolímero em bloco anfifílico da 20 invenção ou uma mistura de pelo menos dois de tais copolímeros como os únicos agentes quimioterapêuticos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção juntamente com objetivos e vantagens adicionais desta, podem ser melhor compreendidos com 25 referência à descrição a seguir tomada em conjunto com os desenhos anexos, nos quais:

A Fig. 1 é um diagrama ilustrando os efeitos do PLURONIC[®] F127 sobre a taxa de crescimento da linhagem celular MCF-7 de câncer de mama humano.

A Fig. 2 é um diagrama ilustrando os efeitos do PLURONIC[®] F127 sobre a taxa de crescimento da linhagem celular SK-BR-3 de câncer de mama humano.

5 A Fig. 3 é um diagrama ilustrando os efeitos do PLURONIC[®] F127 sobre a taxa de crescimento de células vasculares do músculo liso humano estimulado por FCS.

A Fig. 4 é um diagrama ilustrando os efeitos do PLURONIC[®] F127 sobre a taxa de crescimento de células aórticas do músculo liso de rato estimulado por FCS.

10 A Fig. 5 é um diagrama ilustrando uma comparação da citotoxicidade mediada por célula do PLURONIC[®] F127 e Triton X-100.

A Fig. 6 é um diagrama ilustrando o efeito de inibição do crescimento celular de diferentes copolímeros em bloco anfifílicos sobre células do músculo liso vascular humano estimulado por FCS.

20 A Fig. 7 é um diagrama ilustrando a correlação entre a inibição da taxa de crescimento do PLURONIC[®] F127 sobre células do músculo aórtico de rato estimuladas e o efeito do PLURONIC[®] F127 no bloqueio da ligação do fator de crescimento de fibroblasto a receptores nas células de músculo liso.

25 A Fig. 8 é um diagrama ilustrando o efeito do PLURONIC[®] F127 no bloqueio da ligação do fator de crescimento derivado de plaqueta aos receptores em células do músculo liso aórtico de rato.

30 A Fig. 9 é um diagrama ilustrando a densidade celular em uma fibra oca com células cancerígenas U967/gtb implantada em camundongos com ou sem tratamento com PLURONIC[®] P105.

A Fig. 10 é um diagrama ilustrando a densidade celular em uma fibra oca com células cancerígenas H69 implantada em camundongos com ou sem tratamento com PLURONIC[®] P105.

5 A Fig. 11 é um diagrama ilustrando o índice de sobrevivência de células cancerígenas U937/gtb expostas a diferentes copolímeros em bloco anfifílicos.

As Figs. 12A a 12O são diagramas ilustrando o índice de sobrevivência de células cancerígenas U937/gtb expostas a diferentes copolímeros em bloco anfifílicos.

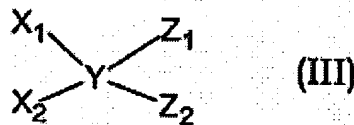
10 E as Figs. 13A a 13 C são diagramas ilustrando o índice de sobrevivência de diferentes linhagens de células cancerígenas expostas a PLURONIC[®] P84, F127 ou L121.

DESCRIÇÃO DETALHADA

15 A presente invenção refere-se genericamente ao tratamento de câncer e em particular ao uso de copolímeros em bloco anfifílicos para inibir e reduzir a taxa de crescimento e a taxa de proliferação de células cancerígenas.

20 Os compostos ativos anti-câncer da presente invenção são copolímeros em bloco anfifílicos de monômeros hidrofóbicos e hidrofílicos. Os copolímeros em bloco, desta forma, compreendem pelo menos uma parte solúvel em água (hidrofílica) e pelo menos uma parte menos solúvel em
25 água ou mesmo insolúvel em água (hidrofóbica). Nos copolímeros em bloco presentemente preferidos, uma cadeia central hidrofóbica é circundada por pelo menos duas cadeias laterais hidrofílicas. Mais preferivelmente, a cadeia central hidrofóbica apresenta uma primeira
30 extremidade de cadeia conectada a pelo menos uma,

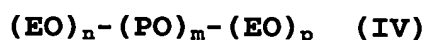
preferivelmente uma ou duas, cadeias laterais hidrofílicas e apresenta uma segunda extremidade de cadeia conectada a pelo menos uma, preferivelmente uma ou duas, cadeias laterais hidrofílicas. As fórmulas (II) e (III) abaixo
 5 ilustram esquematicamente tais copolímeros em bloco anfifílicos:



10 onde X, X₁, X₂ e Z, Z₁, Z₂ representam uma cadeia lateral hidrofílica respectiva e Y representa uma cadeia central hidrofóbica. Em uma implementação preferida X = Z, e X₁=X₂, Z₁=Z₂ e mais preferivelmente X₁=X₂=Z₁=Z₂.

Em uma realização preferida, os copolímeros em bloco
 15 anfifílicos da presente invenção são copolímeros em bloco de óxido de etileno. Vários de tais copolímeros diferentes estão disponíveis atualmente de diferentes fabricantes, incluindo PLURONIC[®] e TETRONIC[®] da BASF Corporation.

Em resumo, o PLURONIC[®] é um copolímero de óxido de
 20 etileno (EO) e óxido de propileno (PO) apresentando a estrutura geral (III):



25 ou a estrutura mais detalhada (I):



Em uma realização preferida $n = p$.

A Tabela I abaixo lista vários polímeros PLURONIC[®] disponibilizados pela BASF e que podem ser utilizados de acordo com a presente invenção.

5

Tabela I - copolímeros PLURONIC[®]

Nome	Peso molecular médio (g/mol)	Viscosidade (cps)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (%)	Ponto de fusão (°C)
L31	1100	175*	>10	-
L35	1900	375*	>10	-
L43	1850	310*	>10	-
L44	2200	440*	>10	-
L61	2000	325*	insolúvel	-
L62	2500	450*	>10	-
L64	2900	850*	>10	-
L81	2750	475*	Insolúvel	-
L92	3650	700*	>1	-
L101	3800	800*	insolúvel	-
L121	4400	1200*	insolúvel	-
P65	3400	180**	>10	-
P84	4200	280**	>10	-
P85	4600	310**	>10	-
P103	4950	285**	>10	-
P104	5900	390**	>10	-
P105	6500	750**	>10	-
P123	5700	350**	>10	-
F38	4700	250***	>10	48
F68	8400	1000***	>10	52

Nome	Peso molecular médio (g/mol)	Viscosidade (cps)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (%)	Ponto de fusão (°C)
F77	6600	480***	>10	48
F87	7700	700***	>10	49
F88	11400	2300***	>10	54
F98	1300	2700***	>10	58
F108	14600	2800***	>10	57
F127	12600	3100***	>10	56

* Viscosidade [Brookfield] 25°C

** Viscosidade [Brookfield] a 60°C

*** Viscosidade [Brookfield] a 77°C

5 Como sabido na técnica, a designação alfabética do nome do produto PLURONIC® denota a forma física do produto a 25°C, onde "L" representa a forma líquida, "P" representa a forma de pasta e "F" representa a forma sólida. O primeiro dígito ou os dois primeiros dígitos em um nome de produto com três dígitos multiplicados por 300 indicam o peso molecular médio aproximado da cadeia central hidrofóbica de óxido de propileno. O último dígito, quando multiplicado por 10, indica o teor de óxido de etileno aproximado (em %) do polímero. Este teor de óxido de etileno pode ser calculado pela equação (1):

$$EO = \frac{44(n+p)}{44(n+p)+58m} \quad (1)$$

onde m, n e p são definidos na estrutura (I).

Se a parte hidrofóbica ou solúvel em lipídeo (PO) é reduzida em demasia, isto é, m é um número integrador pequeno, o efeito inibidor de crescimento é reduzido consideravelmente. Como consequência, os copolímeros PLURONIC[®] preferidos da presente invenção são, por esta razão, aqueles que apresentam uma parte hidrofóbica que é de pelo menos 2000 g/mol, isto é, aqueles polímeros PLURONIC[®] da Tabela I que apresentam um nome de produto com três dígitos ou em que o primeiro dígito no nome do produto é acima de seis.

Adicionalmente, mostrou-se também que os copolímeros PLURONIC[®] apresentando um teor hidrofílico alto, isto é, um teor de óxido de etileno aproximado de cerca de 80% ou mais, apresentam o efeito anti-câncer menos efetivo dos copolímeros testados. Estes copolímeros apresentam um 8 como último dígito no nome do produto na Tabela I.

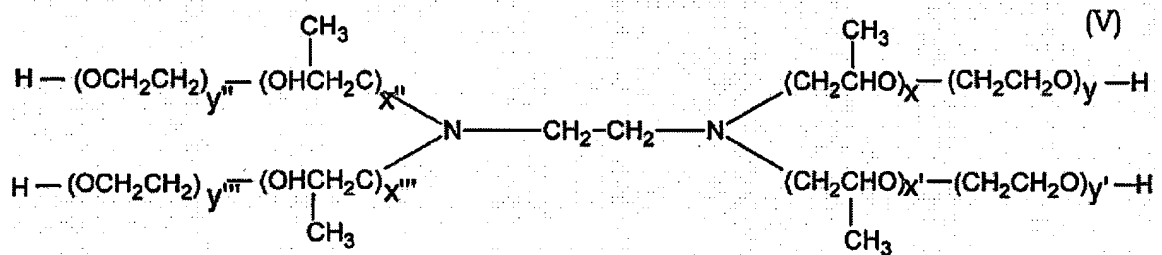
Se o teor de óxido de etileno do copolímero em bloco é muito baixo em relação ao teor de óxido de propileno, o copolímero é menos solúvel em água ou mesmo insolúvel em água. Tais copolímeros em bloco podem ser menos úteis clinicamente na medida em que então um solvente não aquoso deve ser utilizado.

Além disto, se tanto m, n e p na estrutura (I) forem muito baixos, tal como L31, L42, L43, L44, L61, L62 e L63, isto é, um copolímero em bloco hidrofóbico relativamente curto, o polímero se torna tóxico tanto para cce cancerígenas quanto para células não cancerígenas. Como consequência, concentrações farmacêuticas mais baixas devem ser utilizadas para tais copolímeros.

Exemplos de copolímeros PLURONIC[®] atualmente preferidos incluem F127, P94, P105, P123, F87 e L121 e em particular F127.

Foram conduzidos experimentos nos quais uma das cadeias laterais hidrofílicas de um copolímero PLURONIC[®] é removida. Em tal caso, o efeito inibidor é consideravelmente reduzido ou mesmo perdido. Como consequência, copolímeros anfifílicos preferidos da presente invenção compreendem pelo menos duas cadeias hidrofílicas (óxido de polietileno) conectadas a uma cadeia hidrofóbica (óxido de polipropileno).

Outros copolímeros relacionados que podem ser utilizados de acordo com a invenção são os polímeros TETRONIC[®] também disponibilizados pela BASF Corporation. Estes copolímeros podem ser representados pela seguinte estrutura (V):



A Tabela II abaixo lista algumas propriedades dos polímeros TETRONIC[®].

Tabela II - copolímeros TETRONIC[®]

Nome	Peso molecular médio (g/mol)	Viscosidade (cps)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (%)	Ponto de fusão (°C)
304	1650	450*	>10	-
701	3600	600*	insolúvel	-
901	4700	700*	insolúvel	-
904	6700	320**	>10	-
908	25000	325***	>10	58
1107	15000	1100***	>10	51
1301	6800	1000*	insolúvel	-
1307	18000	2700***	>10	54

* Viscosidade [Brookfield] 25°C

** Viscosidade [Brookfield] a 60°C

*** Viscosidade [Brookfield] a 77°C

5

Destes copolímeros TETRONIC[®], o TETRONIC[®] 1307 é um copolímero anfifílico atualmente preferido de acordo com a presente invenção. O copolímero 1307 apresenta um efeito anti-câncer eficiente, enquanto sendo solúvel em água e relativamente não tóxico a células não em proliferação.

10

Também outros copolímeros em bloco anfipáticos (anfifílicos) podem ser utilizados de acordo com a invenção. Por exemplo, um copolímero apresentando uma cadeia central de poliestireno conectada as respectivas cadeias laterais de óxido de polietileno, apresenta um efeito inibidor de crescimento. Desta forma, a presente invenção engloba também outro copolímero em bloco anfifílico além dos compreendendo uma cadeia de óxido de

15

polietileno e cadeias laterais de óxido de polietileno múltiplas.

A BASF Corporation tem também outros copolímeros em bloco anfifílicos relacionados que se relacionam com os copolímeros PLURONIC[®] e TETRONIC[®]. O PLURONIC[®] R é um copolímero no qual o óxido de etileno e o óxido de propileno apresentam locais alterados em comparação com o PLURONIC[®]. Em outras palavras, o polímero apresenta a seguinte estrutura geral:

10



A Tabela III lista tais copolímeros disponíveis.

15

Tabela III - copolímeros PLURONIC[®] R

Nome	Peso molecular médio (g/mol)	Viscosidade (cps)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (%)	Ponto de fusão (°C)
10R5	1950	440*	>10	-
17R2	2150	450*	>10	-
17R6	2650	600*	>10	-
25R4	3600	1100*	>10	-
31R1	3250	660*	>1	-

* Viscosidade [Brookfield] a 25°C.

Correspondentemente, copolímeros nos quais o óxido de etileno e o óxido de propileno do TETRONIC[®] apresentam locais alterados são denotados como polímeros TETRONIC[®] R.

20

A Tabela IV lista tais polímeros disponibilizados pela BASF Corporation.

Tabela IV - copolímeros TETRONIC[®] R

Nome	Peso molecular médio (g/mol)	Viscosidade (cps)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (%)	Ponto de fusão (°C)
150R1	8000	1840*	insolúvel	-
90R4	6900	3870*	>10	-

5 * Viscosidade [Brookfield] a 25°C.

Deve ser observado que quando o peso molecular dos copolímeros é colocado neste documento, significa o peso molecular teórico médio. Como bem conhecido de um
 10 especialista na técnica, em uma dada batelada de um copolímero particular nem todas as moléculas do polímero irão apresentar comprimento e peso molecular idênticos. Desta forma, um dado peso molecular é um valor médio e há uma distribuição em torno deste valor médio. A mesma
 15 discussão da distribuição em torno de um valor médio se aplica à hidrofiliabilidade do copolímero, por exemplo, tal como expressa pelo teor médio de óxido de etileno do polímero.

Os copolímeros da invenção são inibidores efetivos do
 20 crescimento de câncer *in vitro* mesmo em doses muito baixas. O efeito de inibição de crescimento é, além disto, mais pronunciado em células cancerígenas de crescimento rápido quando em comparação com células cancerígenas de crescimento lento. Adicionalmente, pelo menos alguns dos

polímeros em bloco anfifílicos da presente invenção não apresentam qualquer função afetando a proliferação de células não cancerígenas, a não ser que sejam estimuladas pela adição de fatores de crescimento diferentes.

5 Os copolímeros podem ser utilizados para reduzir e normalizar a taxa de crescimento de diferentes tipos de linhagens de célula cancerígena. Os copolímeros, além disto, parecem reduzir a alta proliferação para a taxa de crescimento normal, mas não além. Como consequência, as
10 células não cancerígenas não serão afetadas uma vez que já proliferam na taxa de crescimento normal baixa.

Uma vez a taxa de crescimento das células cancerígenas ter sido reduzida, o sistema imunológico do paciente (humano) pode mais efetivamente lidar com e
15 combater as células cancerígenas de maneira a eliminar o câncer.

Os copolímeros da presente invenção podem também atuar na prevenção ou pelo menos na redução da taxa na qual a mutação ocorre nas células cancerígenas. Esta observação
20 é extremamente importante, uma vez que reduz o risco de formação de células cancerígenas que, devido às mutações, são mais propícias a evitar ou combater os mecanismos de defesa inerentes ao câncer de um indivíduo.

De acordo com a invenção, os copolímeros em bloco
25 anfifílicos podem ser providos como formulações farmacologicamente aceitáveis, utilizando-se métodos de formulação conhecidos dos especialistas na técnica. Estas formulações podem ser administradas por rotas padrão. Em geral, o copolímero pode ser administrado por via
30 intravenosa, subcutânea, bucal, retal, dérmica, nasal,

oral, brônquica, tópica, por qualquer outra rota parenteral ou por inalação, na forma de uma preparação farmacêutica compreendendo o ingrediente ativo em uma forma de dosagem farmacêuticamente aceitável.

5 Uma rota de administração atualmente preferida é uma administração intravenosa, na qual a composição farmacêutica compreende o copolímero anfifílico da invenção em uma solução de um solvente selecionado.

10 Em uma realização de administração particular, a solução contendo o copolímero é injetada uma vez ou preferivelmente múltiplas vezes a uma pessoa necessitando de tratamento de câncer. É também possível se empregar uma administração contínua ou semi-contínua do medicamento a partir, por exemplo, de uma bomba médica ou outro
15 equipamento de administração. Também administrações por meio da assim chamada liberação lenta é possível e dentro do escopo da presente invenção.

Em uma outra realização particular, uma administração local no ou em conexão com o tumor pode ser utilizada para
20 possibilitar uma concentração local relativamente alta do ingrediente ativo. Esta administração local pode ser acompanhada de uma ou mais administrações sistêmicas.

Em geral, as formulações são preparadas por mistura uniforme e íntima do ingrediente ativo em associação com
25 veículos preferivelmente líquidos ou algumas vezes veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então, se necessário, formatação do produto.

Formulações adequadas para administração parenteral incluem soluções injetáveis estéreis aquosas e não aquosas
30 que podem conter anti-oxidantes, tampões, bacteriostáticos

e solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do receptor a que se destina, e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas
5 em recipientes de dose unitária ou de dose múltipla, por exemplo, ampolas e frascos selados, e podem ser armazenadas em condições de liofilização requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo, água injetável, imediatamente antes da utilização.

10 Em particular para os copolímeros insolúveis em água da presente invenção, outros meios além dos meios aquosos podem ser utilizados quando da injeção dos fármacos. Um exemplo de tal meio é polietilenoglicol (PEG). Outros exemplos incluem emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo. Um
15 óleo mineral ou outra substância oleosa tal como Drakeol 6VR ou Drakeol 5 (Penreco, Butler, PA) pode ser utilizado como a fase oleosa da emulsão. A fase aquosa pode ser solução salina fisiológica tamponada com fosfato ou outra solução salina fisiológica. A proporção de óleo para água
20 é preferivelmente entre aproximadamente 80:20 e 1:100.

Formulações adequadas para administração oral podem ser apresentadas como cápsulas, pílulas ou tabletes cada um contendo uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo, como pó ou grânulos; como uma solução ou uma
25 suspensão ou emulsão em um líquido aquoso ou um líquido não aquoso. Formulações adequadas para administração tópica à pele podem ser apresentadas como unguentos, cremes, géis e pastas compreendendo o ingrediente a ser administrado em um veículo farmacologicamente aceitável. Formulações para
30 administração retal podem ser apresentadas como um

supositório com uma base adequada compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau ou um salicilato. Formulações adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, cremes, géis, pastas, espumas ou 5 formulações em spray contendo em adição ao ingrediente ativo veículos conhecidos na técnica como apropriados.

Exemplos de formulações em dosagem unitária são aquelas contendo uma dose ou unidade diária, uma sub-dose diária, conforme mostrado acima, ou uma fração apropriada 10 desta, do ingrediente administrado.

A dosagem máxima permitida que pode ser utilizada de acordo com a presente invenção depende, entre outros, da toxidez do copolímero em bloco anfifílico particular, de seu efeito anti-câncer, isto é, do efeito inibidor sobre a 15 taxa de crescimento, e da rota de administração. A concentração máxima permitida de um copolímero anfifílico pode ser estimada de acordo com o estudo de toxidez descrito na seção dos Exemplos do presente documento. O resultado de tal estudo de toxidez em camundongos ou outro 20 animal pode ser então correlacionado com as concentrações máximas permitidas estimadas para outros animais, incluindo humanos, utilizando-se técnicas bem conhecidas. Por exemplo, pode ser utilizada a tabela de fator de conversão de dosagem de Freireich et al. [17]. De acordo com esta 25 tabela de fator de conversão um fato de conversão de camundongo para humano de cerca de 1/12 é sugerido, implicando no fato de se uma concentração de polímero máxima de X% é permitida em camundongos, a concentração máxima estimada correspondente em humanos é de cerca de 30 X/12%.

Por exemplo, estudos de toxidez em camundongo mostraram que a concentração de polímero máxima de cerca de 30% em peso pode seguramente ser injetada em camundongos sem qualquer efeito colateral. Isto então corresponderia a um limite de concentração de cerca de 2,5% em peso para administração a humanos. Alguns dos copolímeros anfifílicos listados acima da presente invenção, incluindo PLURONIC[®], foram submetidos a estudos em fase clínica e investigações extensivas quanto a toxidez.

As concentrações utilizadas para a administração dos polímeros podem ser determinadas pelo especialista na técnica com base nos procedimentos descritos acima. Espera-se que uma concentração de polímero de até 30% em peso, tal como até 25, 20, 15 ou 10% em peso, ou até 7,5% em peso, preferivelmente 0,001 a 5% em peso, mais preferivelmente pelo menos 0,01% em peso, tal como pelo menos 0,1% em peso, pode ser uma concentração adequada.

Concentrações adequadas podem ser aquelas que produzem uma concentração média no sangue abaixo de 5% em peso, provavelmente menos de 2,5% e especialmente menos de 1% em peso. Uma faixa de concentração preferida é de entre 0,0001% em peso e 1% em peso do polímero, tal como acima de 0,01% em peso, ou acima de 0,1% em peso.

A presente invenção pode ser utilizada em conexão com indivíduos animais, preferivelmente indivíduos mamíferos e mais preferivelmente indivíduos humanos.

Os copolímeros da presente invenção podem ser utilizados para reduzir a taxa de crescimento de tumores de diferentes linhagens e tipos de câncer. A presente invenção é aplicável para diferentes tipos de câncer,

incluindo, mas não se limitando a, sarcomas e carcinomas humanos, Por exemplo, fibrosarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, sarcoma endotelial, sarcoma linfângio, 5 sarcoma linfângio endotelial, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, câncer pancreático, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, 10 carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilífero, adenocarcinomas papilíferos, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor 15 testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de célula pequena, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, hemangioblastoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma, leucemias, por exemplo, 20 leucemia linfocítica aguda (ALL), e leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritoleucemia), leucemias crônicas (leucemia mielocítica crônica, leucemia granulocítica crônica e leucemia linfocítica crônica), policitemia vera, linfoma 25 (doença de Hodgkin e doença não de Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e doença de cadeia pesada.

A composição farmacêutica da presente invenção pode incluir um dos copolímeros em bloco anfifílicos da 30 invenção. Em uma realização alternativa, a composição

compreende uma mistura de pelo menos dois copolímeros em bloco anfifílicos da invenção.

Além disto, a presente invenção pode ser utilizada como um complemento a outras técnicas de tratamento de 5 câncer tradicionais, por exemplo, irradiação, quimioterapia, tratamento com hormônio, etc., para combater câncer em um paciente.

Os polímeros da invenção podem ser vantajosamente utilizados em conexão com outros fármacos 10 quimioterapêuticos. Neste caso, pelo menos um de tais fármacos quimioterapêuticos pode ser administrado simultaneamente com ou seqüencialmente em relação à administração do pelo menos um copolímero anfifílico da presente invenção.

15 Exemplos de agentes quimioterapêuticos adequados que podem ser utilizados em conexão com os copolímeros da invenção incluem:

- Agentes alquilantes, tais como cisplatina, carboplatina, oxaplatina, mecloretamina, 20 ciclofosfamida, clorambucil;
- Anti-metabólitos, tais como metotrexato, azatioprina, maercaptopurina, tioguanina, fludarabina, pentostatina, cladribina, 5-fluoracil, floxuridina, citostina arabinosídeo;
- 25 • antraciclinas, tais como daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, idarrubicina, mitoxantrona;
- alcalóides vinca, tais como vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina;
- 30 • podofilotoxina, tais como etoposídeo, teniposídeo;

- taxanos, tais como paclitaxel, docetaxel; e
- inibidores de topoisomerase, tais como irinotecan, topotecan, amsacrina, etoposídeo, etoposídeo fosfato, teniposídeo.

5 Uma teoria possível para o efeito de inibição do crescimento dos copolímeros anfifílicos da invenção é dada a seguir. A presente invenção, no entanto, não está presa de forma alguma a esta teoria. Os copolímeros são preferivelmente solúveis em água de tal forma que, pela

10 administração *in vitro*, podem alcançar e interagir com as células cancerígenas. A parte hidrofóbica dos copolímeros pode então penetrar na membrana celular e se ligar a esta. As partes hidrofílicas evitam que o copolímero penetre inteiramente na membrana. Isto significa que os

15 copolímeros tipicamente serão ancorados na superfície da célula. Uma vez fixados na membrana, os copolímeros podem exercer sua ação inibidora de crescimento celular de diferentes formas.

Os copolímeros anfifílicos podem se ligar a fatores

20 de crescimento e, desta forma, os desativar ou pelo menos evitar que se liguem e ativem os receptores de crescimento nas membranas das células cancerígenas. Isto foi observado em experimentos com um dos copolímeros em bloco anfifílicos da invenção que é capaz de bloquear a ligação do fator de

25 crescimento de fibroblasto 2 (FGF2, também chamado de FGF básico) e do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) aos respectivos receptores nas membranas celulares.

Adicionalmente, o copolímero anfifílico poderia bloquear receptores de crescimento na membrana e prevenir

estes receptores de se unirem, o que é sempre necessário para o envio de um sinal para a célula.

Adicionalmente, ou alternativamente, os copolímeros anfifílicos podem ser ligar a receptores de crescimento e, desta forma, os desativar ou pelo menos os bloquear parcialmente e, desta forma, evitar que os fatores de crescimento se liguem e ativem os receptores.

Alguns dos copolímeros em bloco anfifílicos da presente invenção foram previamente utilizados em conexão com agentes anti-neoplásicos. Por exemplo, sabe-se [18] que uma combinação de um polímero PLURONIC[®] e óxido de polietileno pode ser utilizada para reduzir a toxidez de um agente anti-neoplásico e para aumentar a atividade anti-câncer i) pelo aumento da estabilidade do agente na corrente sanguínea, ii) tornando o agente mais solúvel ou iii) pelo aumento do transporte do agente através das membranas celulares. Sabe-se também [19] que os copolímeros em bloco PLURONIC[®] afetam vários mecanismos de resistência a droga distintos incluindo inibição dos transportadores de efluxo de fármaco, abolindo o seqüestro de fármaco em vesículas ácidas e inibindo o sistema de desintoxicação de glutiona/glutathiona S-transferase. Todos estes mecanismos de resistência a droga são dependentes de energia e, desta forma, a depleção de ATP induzida pelos copolímeros em bloco PLURONIC[®] em células cancerígenas resistentes a multi-drogas é considerada como a razão para a quimiossensibilização experimentada pela administração combinada do antibiótico antraciclina e copolímeros PLURONIC[®].

Entretanto, até o momento não foi mostrado que copolímeros em bloco anfifílicos, tais como os copolímeros PLURONIC[®], apresentam efeito anti-câncer *per se* na forma de inibição da proliferação e taxa de crescimento de células cancerígenas. Assim, não foi mostrado que um medicamento anti-câncer efetivo pode compreender um copolímero em bloco anfifílico da presente invenção *sem* qualquer dos agentes quimioterapêuticos do estado da técnica e ainda assim ser efetivo na prevenção ou tratamento do câncer.

Um primeiro aspecto da invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um copolímero em bloco anfifílico da presente invenção como agente anti-proliferação celular ou anti-crescimento celular. Este aspecto refere-se também ao uso de um copolímero em bloco anfifílico da invenção na fabricação de um medicamento anti-proliferação celular ou anti-crescimento celular. A invenção também engloba um método *in vitro* de modulação, isto é, de redução ou mesmo inibição, da taxa de proliferação ou taxa de crescimento de uma célula, preferivelmente uma célula cancerígena. Este método envolve o contato da célula, preferivelmente a célula cancerígena, com um copolímero em bloco anfifílico. O copolímero em bloco anfifílico é preferivelmente adicionado no meio de cultura utilizado para a célula. Uma realização adicional refere-se a um método *in vivo* de modulação, isto é, de redução da taxa de proliferação ou taxa de crescimento celular, preferivelmente uma célula cancerígena. O método envolve a administração de uma composição farmacêutica de acordo com o primeiro aspecto da invenção a um indivíduo, onde este indivíduo é um animal,

preferivelmente um indivíduo mamífero e mais preferivelmente um indivíduo humano.

Um segundo aspecto da invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um copolímero em bloco anfifílico da presente invenção como agente quimioterapêutico para o tratamento ou prevenção de câncer desde que o copolímero em bloco anfifílico não seja o PLURONIC[®] F68 (peso molecular médio de 8400 g/mol, teor médio de óxido de etileno de $81,8 \pm 1,9\%$, ponto de fusão de 52°C e uma viscosidade Brookfield média de 1000 cps a 77°C e uma estrutura química média de $\text{OH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{80}-\text{(CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O)}_{27}-\text{(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{80}-\text{H}$). Uma outra realização refere-se ao uso de um copolímero em bloco anfifílico como agente quimioterapêutico (agente ativo anti-câncer) na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de câncer desde que o copolímero em bloco anfifílico não seja o PLURONIC[®] F68. Este aspecto refere-se também a um método para o tratamento ou prevenção de câncer em um indivíduo, preferivelmente um indivíduo mamífero e mais preferivelmente um indivíduo humano. O método envolve a administração de uma composição farmacêutica de acordo com o segundo aspecto ao indivíduo.

Um terceiro aspecto da invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um copolímero em bloco anfifílico da presente invenção para a redução ou inibição da taxa de crescimento de células cancerígenas em um indivíduo, preferivelmente um indivíduo mamífero e mais preferivelmente um indivíduo humano, que sofre de câncer. Uma realização deste aspecto refere-se ao uso de um copolímero em bloco anfifílico da invenção na fabricação de

um medicamento para a inibição ou redução da taxa de crescimento de células cancerígenas no indivíduo que sofre de câncer. Este aspecto refere-se também a um método para a redução da taxa de crescimento de células cancerígenas em um indivíduo sofrendo de câncer, onde o método envolve a administração da composição farmacêutica do terceiro aspecto ao indivíduo.

Um quarto aspecto da invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um copolímero em bloco anfifílico representado pela fórmula (IV):



onde m, n e p são cada um integradores, preferivelmente integradores múltiplos, para o tratamento ou prevenção de câncer em um indivíduo, preferivelmente um indivíduo mamífero e mais preferivelmente um indivíduo humano, desde que o câncer não seja câncer do cólon ou câncer do reto. Uma realização ensina que a utilização de um copolímero em bloco anfifílico representado pela fórmula (IV) como um agente quimioterapêutico na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de câncer em um indivíduo desde que o dito câncer não seja câncer do cólon ou câncer do reto. Este aspecto refere-se também a um método para o tratamento ou prevenção de câncer diferente de câncer do cólon ou do câncer do reto em um indivíduo pela administração da composição farmacêutica do quarto aspecto ao indivíduo.

Um quinto aspecto da invenção refere-se a um método, incluindo um método *in vitro*, para o bloqueio da ligação de

um fator de crescimento a um receptor de fator de crescimento em uma membrana celular de uma célula. O método compreende o contato da célula com um copolímero em bloco anfifílico de acordo com a presente invenção.

5

EXEMPLOS

Nos experimentos, diferentes copolímeros em bloco anfifílicos são utilizados. Os polímeros PLURONIC[®] e TETRONIC[®] foram obtidos da BASF Corporation. O copolímero em bloco anfifílico denotado por DORVAL 1 é uma variante de um polímero PLURONIC[®], mas com a cadeia de óxido de etileno central trocada por uma cadeia de poliestireno correspondente. O copolímero em bloco foi adquirido da Polymer Source Inc., Canadá. O copolímero apresentava a seguinte estrutura esquemática: $(EO)_x(St)_y-(EO)_x$, onde $x \approx$ 10 70 e $y \approx 27$, M_n : PEO(3100)-PSt(2800)-PEO(3100) e $M_w/M_n =$ 15 1,11.

Inibição da taxa de crescimento de células de câncer de mama.

O efeito do PLURONIC[®] F127 foi testado sobre o crescimento celular de linhagens de célula de câncer de 20 mama humano cultivadas *in vitro*. A taxa de crescimento foi determinada com a incorporação de ³H-timidina. Foram examinadas uma linhagem de célula de câncer de mama de crescimento agressivo, MCF-7, e uma linhagem de célula de 25 câncer de mama de crescimento mais lento, SK-BR-3.

Resumidamente, cerca de 3×10^4 células foram semeadas em placas micro-título de 24 poços em 1,0 ml de meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de FCS (soro fetal bovino), insulina 30 (1 mg/100 ml) e 1% de antibiótico, e incubadas (ar úmido,

5% de CO₂, 37°C) durante a noite. Após a incubação por uma noite, o meio foi removido a vácuo utilizando-se pipetas Pasteur esterilizadas e foi trocado por 1,0 ml de RPMI com 0,1% de FCS por poço. Após incubação por uma noite, o RPMI
5 suplementado com diferentes concentrações (0,01, 0,1, 0,3, 1 e 2% em peso) de PLURONIC[®] F127 modulador de taxa de crescimento e/ou 10% de FCS foram adicionados às células (n=3). Em todos os poços, exceto os poços de controle e os poços com 1% de F127, foi também adicionado FCS aos poços.
10 Os poços foram incubados por cerca de 15 horas.

Foi adicionado 1 µCi/ml de ³H-timidina (Amersham-Pharmacia Biotech) por poço e incubou-se por 4 horas. Ao final do período de rotulagem, o meio foi removido e as células foram enxaguadas duas vezes em PBS e fixadas com
15 TCA 10% (ácido tricloroacético) gelado (4°C) por 10 minutos. O TCA foi então removido e as monocamadas foram lavadas em etanol 95% e secadas ao ar à temperatura ambiente por 20 minutos.

Posteriormente, 1,0 ml de NaOH 0,2 M foi adicionado
20 por poço e incubou-se por pelo menos uma hora à temperatura ambiente para dissolver as células. 1,0 ml do conteúdo de cada poço foi diluído em 4 ml de solução de cintilação Highsafe II em tubos de cintilação de 5 ml. A radioatividade foi medida em um contador beta.

25 Conforme pode ser observado nas Figs. 1 e 2, o PLURONIC[®] F127 reduziu nitidamente o crescimento de ambas as linhagens de célula de câncer de mama. O efeito foi mais pronunciado no câncer de crescimento rápido (MCF-7) onde 1% de PLURONIC[®] F127 reduziu a proliferação celular em
30 aproximadamente 80%. O efeito foi também pronunciado em

SK-BR-3 onde o crescimento foi reduzido em aproximadamente 60%.

A adição de um estímulo de crescimento de FCS aumentou a proliferação em SK-BR-3, mas não em MCF-7, 5 provavelmente porque a MCF-7 prolifera em si na taxa máxima. Na SK-BR-3, o efeito do PLURONIC[®] F127 foi aumentado em células estimuladas por FCS em comparação com as células não estimuladas.

O PLURONIC[®] F127 foi efetivo como um inibidor da 10 proliferação mesmo na concentração mais baixa testada (0,01% em peso).

Inibição da síntese de DNA em células de músculo liso estimuladas.

Os experimentos descritos acima para a taxa de 15 crescimento foram também conduzidos *in vitro* em células do músculo liso de humano, de rato e de coelho. Os experimentos confirmaram que o PLURONIC[®] F127 inibiu a síntese de DNA de maneira dependente de dose conforme medida pela incorporação de timidina em células do músculo 20 liso vascular com crescimento estimulado (presença de FCS 10%) de humano, rato e coelho. Entretanto, o PLURONIC[®] F127 não afetou a taxa de crescimento de células de músculo não estimuladas.

Resumidamente, para vasos maiores, o vaso dissecado 25 foi aberto e o endotélio foi retirado por raspagem com um bisturi. O vaso foi virado e adventício adicional foi retirado por raspagem. Para os vasos menores, o endotélio foi removido por lavagem do lúmen do vaso com Triton X-100 0,1% por 10 segundos, seguindo-se lavagem com meio de 30 cultura DMEM (meio de Eagle modificado da Dulbecco).

O vaso foi cortado em peças menores, com cerca de 1x1 mm. As peças do vaso foram transferidas para o frasco de meio de cultura com DMEM suplementado com FCS 10% e antibiótico 1% para incubação por 10 dias. Para células
5 humanas, o meio DMEM foi suplementado também com soro humano 10% (NHS).

Em uma passagem das células, o meio de cultura gasto foi retirado com pipeta e descartado. As células foram enxaguadas pela adição de PBS (10 ml/75 cm² de frasco) aos
10 frascos, tomando-se cuidado para não destruir a monocamada celular. A monocamada é enxaguada agitando-se brandamente o frasco para frente e para trás. O PBS foi removido e descartado. Foi adicionada tripsina (3,5 ml/75 cm² de
15 frasco) aos frascos e os frascos foram agitados gentilmente para se assegurar que as monocamadas por inteiro fossem cobertas com a solução de tripsina.

Os frascos foram incubados por cerca de 3-5 minutos até que as células começassem a se soltar. Foram adicionados 3,5 ml de FCS 10% por frasco para "neutralizar"
20 a tripsina e as soluções foram pipetadas para cima e para baixo até que as células estivessem dispersas em uma suspensão única de célula.

A solução foi centrifugada a 300 g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido e descartado. O pélete de célula
25 foi dissolvido em DMEM e transferido para dois novos frascos de cultura.

Os experimentos de taxa de crescimento celular (síntese de DNA) foram então conduzidos da mesma forma que para as duas linhagens de célula de câncer de mama
30 descritas acima.

A Fig. 3 ilustra os resultados da modulação da taxa de crescimento do PLURONIC[®] F127 em células do músculo liso vascular humano. Observa-se que o PLURONIC[®] F127 apresenta uma inibição da taxa de proliferação dependente da dose em células de músculo estimuladas com FCS. Os resultados comparativos foram também obtidos para células de músculo liso de rato e de coelho.

Em um estudo comparativo, foi investigado o efeito da inibição da síntese de DNA em células de músculo liso estimuladas com FCS (10%) do F127 e outros polímeros PLURONIC[®]. Os resultados são apresentados na Tabela V abaixo normalizados para a síntese de DNA (conforme determinada utilizando-se o método a base de timidina descrito acima) das células de controle crescidas em meio suplementado com FCS 10%. As células testadas foram crescidas em meio suplementado com FCS 10% e um copolímero a uma concentração de 10, 1 ou 0,1 mg/ml. Nestes testes, a síntese de DNA das células de controle é considerada como 100% e as substâncias testadas foram expressas como percentagem da síntese de DNA das células de controle.

Tabela IV - Inibição da síntese de DNA

Polímero PLURONIC [®]	Síntese de DNA normalizada em relação a células FCS 10% (%)		
	10 mg/ml	1 mg/ml	0,1 mg/ml
L31	-39,0±6,8	3,4±6,8	91,5±4,1
F38	102,7±11,6	68,5±4,1	83,6±8,9
F68	131,8±6,8	93,2±6,8	97,7±5,7
F98	49,3±6,9	61,6±1,4	52,1±8,2
L121	47,7±2,3	95,5±0,9	127,3±11,4
P123	-9,6±1,6	68,0±8,0	108,8±5,6
F127	1,4±3,4	30,1±4,1	56,2±7,5

Estes experimentos confirmam que os polímeros PLURONIC[®] podem ser utilizados para a inibição da síntese de DNA. Os experimentos mostram também que o PLURONIC[®] F68 não parece exercer qualquer efeito inibidor. Na
5 concentração mais alta testada (10 mg/ml), o L31 apresentou uma tendência a matar as células.

Inibição do crescimento celular em células de músculo liso estimuladas.

De maneira a confirmar que a inibição da síntese de
10 DNA foi devida ao número reduzido de células, isto é, inibição da taxa de proliferação, um método colorimétrico foi utilizado para mensurar o número de células depois do tratamento com PLURONIC[®] F127.

Células de músculo liso vascular de aorta de rato
15 foram obtidas utilizando-se o procedimento descrito acima. Foram semeadas 5000 células de aorta de rato em 200 µl de DMEM suplementado com FCS 10% por poço em uma placa CellTiter 96[™] AQueous (Promega). As células foram deixadas em incubação por cerca de 1 dia. O meio foi retirado por
20 pipeta e descartado e trocado por 200 µl de DMEM com FCS 0,1% por poço.

Após 2 dias, foi adicionado meio DMEM (controle negativo), meio DMEM com FCS 10% (controle positivo), meio DMEM com PLURONIC[®] F127 1 ou 5% ou meio DMEM com FCS 10% e
25 PLURONIC[®] F127 1 ou 5%, a poços diferentes (n=3) e incubou-se de acordo com o protocolo fabricante do ensaio de proliferação/citotoxicidade celular não radioativo CellTiter 96[™].

Os poços foram então lavados três vezes com PBS de
30 acordo com o protocolo do fabricante e foram então

adicionados 20 µl de solução de MTS por poço. A placa foi incubada por 1-4 horas e a absorbância foi medida a 490 nm.

Os resultados são ilustrados na Fig. 4. Observa-se no diagrama que o método colorimétrico confirma a inibição da taxa de proliferação celular do PLURONIC[®] F127 observada utilizando-se o método de síntese de DNA descrito acima. O PLURONIC[®] F127 inibiu o efeito estimulante do crescimento do FCS, mas não apresenta qualquer efeito sobre células não estimuladas.

10 **Citotoxicidade mediada por célula.**

De maneira a se determinar se ao efeito de inibição da proliferação celular do PLURONIC[®] F127 é devido a algum efeito tóxico do copolímero sobre as células, um teste de citotoxicidade mediada por célula foi realizado onde a citotoxicidade do PLURONIC[®] F127 foi comparada com Triton X-100 1%, PEG 10000 e um outro polímero PLURONIC[®], o P123.

O procedimento descrito acima utilizando o ensaio proliferação/citotoxicidade celular não radioativo CellTiter 96[™] da Promega foi realizado utilizando-se diferentes concentrações de PLURONIC[®] F127, Triton X-100 1%, PEG 10000 1% e PLURONIC[®] P123 1%. A Fig. 5 ilustra o efeito citotóxico de diferentes concentrações de PLURONIC[®] F127 expressos em percentagem da citotoxicidade do Triton X-100. O PLURONIC[®] F127 não exibe toxidez celular mesmo à mais alta concentração testada de 5%. Entretanto, o outro polímero PLURONIC[®] testado P123 exibiu citotoxicidade significativa comparativamente mais alta.

Estudo comparativo de copolímeros em bloco anfifílicos.

O efeito de inibição da taxa de crescimento de outros copolímeros em bloco anfifílicos além do PLURONIC[®] F127, incluindo PLURONIC[®] F38, F68, F87, F98, P105, F108 e TETRONIC[®] T908, T1307 da BASF Corporation e DORVAL 1 da
5 Polymer Source Inc., foram testados em células de músculo liso vascular humano estimuladas (FCS 10%).

Os experimentos foram realizados da mesma maneira que o experimento de síntese de DNA a base de timidina descrito acima e ilustrado na Fig. 3, com a diferença de que as
10 concentrações de 1, 0,1 e 0,01% em peso foram testadas por copolímero em bloco.

Os resultados da inibição da taxa de crescimento são apresentados na Fig. 6, onde as taxas de crescimento foram normalizadas em relação à taxa de crescimento celular mais
15 alta (T908 e 0,01% em peso).

Pode se observar na figura que o copolímero apresentando o teor hidrofílico mais alto (cerca de 80%), isto é, F38, F68, F108 e T908, mostrou o menor efeito de inibição de crescimento celular em células de músculo liso
20 estimuladas por FCS. O copolímero F87 apresentou efeito similar ao F127, enquanto que o P1058 alcançou o efeito inibidor mais alto sob as condições experimentais presentes.

Experimentos de ligação.

25 Experimentos de teste foram conduzidos para se determinar se o efeito inibidor da taxa de crescimento do PLURONIC[®] F127 poderia ser mediado através do bloqueio da ligação de diferentes fatores de crescimento aos respectivos receptores em células de músculo liso de aorta
30 de rato.

Células de aorta de rato preparadas como descrito previamente foram adicionadas em meio de cultura (+ FCS 10%) a poços de uma placa micro-título de 24 poços a uma concentração de cerca de 5000 células por poço. A placa
5 foi incubada durante a noite para possibilitar às células formarem uma camada no fundo dos poços. O meio de cultura foi então substituído por meio de cultura suplementado com FCS 0,1% e deixou-se incubar por dois dias.

O meio de cultura foi então removido e os poços foram
10 lavados duas vezes com PBS. Foram adicionados 150 µl de uma solução de NaCl com diferentes concentrações de PLURONIC[®] F127 (2, 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001% em peso) juntamente com 1 µl de ¹²⁵I-FGF2 (fator de crescimento de fibroblasto 2 radiativamente rotulado) ou 1 µl de ¹²⁵I-PDGF
15 (fator de crescimento derivado de plaqueta) diluído em uma solução tampão (NaCl 0,237 M, KCl 0,0054 M, KH₂PO₄ 0,00044 M, CaCl₂ 0,00126 M, MgSO₄ 0,00018 M, HEPES 0,020 M e BSA 0,3%) e incubado por 30 minutos a 37°C. Os poços foram então lavados cinco vezes com PBS (solução salina tamponada
20 com fosfato; 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 1,35 g de Na₂HPO₄ e 8,0 g de NaCl por 1000 ml de H₂O destilada). Foi então adicionado 1 ml de NaOH 0,2 M por poço e a placa foi colocada em um refrigerador durante a noite. A quantidade de ligação dos fatores de crescimento radiativamente
25 rotulados foi então determinada por meio de determinação gama.

Concluiu-se que o PLURONIC[®] bloqueia a ligação dos dois fatores de crescimento a seus respectivos receptores nas células de maneira dependente de dose. Adicionalmente,
30 como ilustrado na Fig. 7, existe uma correlação muito alta

entre as concentrações do F127 necessárias para os efeitos inibidores de crescimento e para a inibição da ligação de FGF2. A Fig. 8 ilustra o correspondente efeito de bloqueio de ligação do polímero F127 sobre PDGF radiativamente rotulado. Como consequência, o bloqueio desta ligação do
5 fator de crescimento aos receptores na membrana celular pode ser pelo menos um dos mecanismos da inibição da taxa de crescimento dos copolímeros em bloco anfifílicos da presente invenção.

10 **Estudo de toxidez em camundongo.**

Os experimentos foram conduzidos para investigar se o PLURONIC[®] P105 produz reações tóxicas após administração intravenosa em camundongos.

15 Dez camundongos albinos NMRI, pesando cerca de 25 g no início, foram utilizados para o experimento. Os animais foram obtidas da Scanbur BK, e foram condicionados por uma semana antes do início do estudo. Os animais foram providos com alimento e água *ad libitum*.

20 A substância ativa PLURONIC[®] P105 foi provida em dois volumes de solução de 10 e 50% em peso, respectivamente, do copolímero em NaCl (9 mg/l) para a solução a 10% e em NaCl (9 mg/l) e PEG para a solução a 50%.

25 Os animais foram separados em cinco grupos e foram tratados i.v. em uma veia da cauda, uma vez ao dia por 5 dias. O volume injetado para todos os grupos foi de 150 µl. As injeções foram realizadas durante 10 segundos.

- Grupo 1: PLURONIC[®] P105 50% (n=2)
- Grupo 2: PLURONIC[®] P105 40% (n=2)
- Grupo 3: PLURONIC[®] P105 30% (n=2)
- 30 • Grupo 4: PLURONIC[®] P105 20% (n=2)

- Grupo 5: PLURONIC[®] P105 10% (n=2)

Os pesos corporais foram registrados antes da primeira administração e no dia 6. Os animais foram observados para sinais clínicos de toxidez (qualidade do pelo, salivação, lacrimação, diarreia, respiração, distúrbios motores, apatia, tremor, convulsões e coma) durante 0-30 minutos às 1, 2, 3, 4, 8, 24, 48 e 72 horas após a administração da substância de teste.

Um estudo exploratório foi realizado em 2 camundongos tratados com PLURONIC[®] P105 10% e em 2 camundongos tratados com PLURONIC[®] P105 50%. Observou-se que os animais tratados com a concentração de P105 mais baixa toleraram bem o tratamento repetido, mas aqueles tratados com P105 50% mostraram caudas edematosas e hemolíticas já na segunda injeção. Adicionalmente, estes dois animais mostraram comportamento motor reduzido e foram subsequentemente sacrificados no terceiro dia após o início do tratamento. Neste ponto, decidiu-se tratar 6 camundongos com a formulação 50% diluída com solução salina para 40%, 30% e 20%.

Os animais tratados com P105 40% mostraram descoloração hemolítica branda das caudas no dia 2, a qual persistiu durante o período de tratamento. Algum edema foi observado. Estes animais mostraram também um ganho de peso reduzido, ver Tabela VI.

Observou-se que os animais que receberam injeção com as diluições de 20% e 30% toleraram bem o tratamento.

Tabela VI - ganho de peso dos camundongos

Concentração de PLURONIC [®]	Ganho de peso médio no dia 6
P105	(g)
40%	0,1
30%	7,2
20%	14,9
10%	6,1

Teste de implante de fibra oca.

Foram conduzidos testes para se investigar se o
 5 PLURONIC[®] P105 inibiu o crescimento de célula tumoral em um
 modelo de fibra oca em camundongo.

Dezoito camundongos albinos NMRI, pesando cerca de 25
 g na chegada, foram utilizados para o experimento. Os
 animais foram obtidos da Scanbur BK, e foram condicionados
 10 por uma semana antes do início do estudo. Os animais foram
 providos com alimento e água *ad libitum*.

O enchimento das fibras foi realizado no Hospital da
 Universidade de Uppsala, Departamento de Farmacologia
 Clínica. As fibras foram preenchidas com as seguintes
 15 células tumorais: fibras amarelas com U936/gtb e fibras
 azuis com H69.

Após raspagem do pelo e desinfecção, uma pequena
 incisão de pele foi feita, sob anestesia com isoflurano,
 nas costas dos animais. Três fibras, duas amarelas e uma
 20 azul, foram implantadas subcutaneamente de maneira
 randômica e a incisão na pele foi fechada utilizando-se
 grampos.

Os animais foram separados em três grupos e foram tratados como se segue intravenosamente em uma veia da cauda uma vez ao dia por 5 dias iniciando-se imediatamente após o implante:

- 5 • Grupo 1: PLURONIC[®] P105 10% diluído em NaCl (n=6)
- Grupo 2: PLURONIC[®] P105 25% diluído em PEG e NaCl (n=6)
- Grupo 3: veículo (n=6)

Os pesos corporais foram registrados antes da primeira administração e antes da eutanásia. Os animais foram observados diariamente para sinais de alteração na ingestão de alimentos, atividade, etc., como sinais de uma alteração do estado de saúde geral. Seis dias depois do implante das fibras, os animais foram anestesiados com isoflurano e aproximadamente 250 µl de sangue foram obtidos do plexo orbital para a hematologia. Posteriormente os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as fibras foram retiradas e colocadas em meio de cultura celular (37°C) antes da avaliação da densidade celular e da viabilidade celular.

A avaliação estatística foi realizada com a utilização do programa Graph Pad Prism versão 4 (Graph Pad Software Inc., San Diego, EUA) em um computador HP Compc dx 2000 em Windows XP. Foi utilizado o teste One-way ANOVA com as comparações múltiplas de Tukey para se testar estatisticamente as diferenças nos parâmetros de hematologia entre os grupos de tratamento. Foi utilizado o teste t pareado para testar estatisticamente as diferenças em pesos antes e depois dos tratamentos.

Não ocorrem quaisquer sinais evidentes de alteração no estado de saúde em qualquer dos animais. Não ocorreram quaisquer diferenças estatisticamente significativas dentro dos grupos no que diz respeito aos pesos antes e depois do
5 tratamento.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos parâmetros de hematologia: RBS ($p=0,0127$, grupo 1 x grupo 3 e grupo 2 x grupo 3), HGB ($p=0,021$, grupo 1 x grupo 3 e grupo 2 x grupo
10 3) e PLT ($p=0,0006$, grupo 1 x grupo 3 e grupo 2 x grupo 3), ver Tabela VII.

Tabela VII - parâmetros de hematologia

Grupo	WBC ($10^9/l$)	RBC ($10^{12}/l$)	HGB (g/l)	HCT (l/l)	PLT ($10^9/l$)
1	9,6±1,1	7,87±0,56	132,8±8,9	0,460±0,144	1014±103,5
2	7,6±1,6	7,94±0,47	134,7±6,1	0,403±0,021	947,0±61,6
3	8,9±1,6	8,65±0,15	148,2±3,8	0,439±0,015	744,7±107,0

15 A densidade celular nas fibras foi significativamente reduzida ($p<0,05$) nas fibras contendo U937/gtb tratadas com a dose alta de PLURONIC[®] P105 em comparação com o controle. Uma tendência semelhante foi observada também para as células implantadas nos animais tratados com a dose baixa
20 de P105, ver Fig. 9. Uma tendência na direção dos valores mais baixos de densidade celular médio foi também observada para a linhagem celular H69 ns animais tratados com o copolímero, ver Fig. 10.

Estimativa *in vitro* da atividade citotóxica dos copolímeros.

O presente estudo tem por objetivo a investigação da atividade citotóxica de diferentes copolímeros PLURONIC[®] e TETRONIC[®]. Como sistemas modelo, foi utilizado um painel bem definido de 10 linhagens de célula tumoral humana selecionadas e uma linhagem de célula de câncer de próstata. Três compostos, selecionados após varredura na linhagem de célula de linfoma sensível U936/gtb, foram investigados em todas as linhagens celulares.

Um sistema modelo utilizado neste estudo é um painel de linhagem celular de dez linhagens de célula tumoral humana [3]. Este conceito se origina do National Cancer Institute (NCI) nos EUA, onde um painel de linhagem celular com aproximadamente 60 linhagens celulares diferentes (representando a maioria das formas de câncer humano) é comumente utilizado para definir o perfil de atividade de um composto novo [4]. O painel de linhagem celular pode classificar agentes com sucesso na medida em que relacionado com um grupo mecanístico específico (por exemplo, inibidores de anti-metabólitos, alquilantes, topoisomerase II) pela utilização de análise de correlação [5]. Foi demonstrado no passado que um número mais limitado (10) de linhagens de célula de tumor humano representando tipos definidos de resistência a droga citotóxica pode ser utilizado com sucesso para a avaliação inicial e classificação mecanística preliminar de agentes anti-câncer [6].

Células tumorais podem ganhar resistência a drogas citotóxicas, e exemplos de mecanismos de resistência

conhecidos são a glicoproteína P (Pgp) e a proteína associada a resistência multi-droga (MRP), atividade aumentada dos sistemas de desintoxicação celular, função alterada das enzimas nucleares alvo como a topoisomerase II (topo II) bem como função de ligação a tubulina alterada e redistribuição sub-celular do fármaco. O painel de linhagem celular utilizado contém linhagens celulares que expressão alguns destes fenótipos [3].

As bombas de efluxo de fármaco, por exemplo, Pgp e MRP, mostram baixa especificidade para substratos e, desta forma, contribuem para a sensibilidade reduzida a agentes de várias classes, por exemplo, alcalóide vinca, antraciclinas, taxanos, epipodofilotoxinas e outros fármacos [7].

Culturas primárias de células tumorais humanas são um sistema modelo alternativo que recebeu relativamente pouca atenção no contexto da seleção e desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, foi demonstrado que ensaios *in vitro* realizados em culturas primárias de diferentes tumores se correlacionam bem com a atividade específica clínica do tipo tumor [8].

A combinação de diferentes fármacos citotóxicos e a criação de preparações de fármacos incluindo compostos que aumentam a absorção do fármaco ou o efeito do fármaco, é um campo crescente na quimioterapia de câncer. Foram propostos numerosos métodos de realização e interpretação de estudos pré-clínicos a respeito de interações entre fármacos. Quando dados de agentes únicos e suas combinações são disponibilizados em concentrações fixadas, o "conceito multiplicativo" (modelo aditivo) é comumente

utilizado. Aqui, uma interação aditiva é definida como uma combinação de dois fármacos que resulta em uma fração sobrevivente iguala o produto das frações sobreviventes dos agentes em separado, o que poderia indicar uma ação independente dos fármacos [9]. Se o efeito da combinação supera o efeito aditivo, a interação é sinérgica.

De maneira a avaliar os padrões de atividade dos fármacos, foi utilizado um painel de linhagem celular humana de quatro linhagens celulares parentais sensíveis, cinco sub-linhagens resistentes a droga, representando diferentes mecanismos de resistência, e uma linhagem celular com resistência primária. As linhagens celulares incluídas eram a linhagem de célula de mieloma RPMI 8226/S e suas sub-linhagens 8226/Dox40 e 8226/LR-5 (cedidas gentilmente por W.S. Dalton, Dept. of Medicine, Arizona Cancer Center, University of Arizona, Tucson, AZ), as linhagens de célula de linfoma U-937/gtb e U-937-Vcr (cedidas gentilmente por K. Nilsson, Dept. of Pathology, University of Uppsala, Suécia), a linhagem celular SCLC NCI-H69 e suas sub-linhagens H69AR (American Type Culture Collection; ATCC, Rockville, MD), a linhagem de célula de adenocarcinoma renal ACHN (ATCC) e a linhagem de célula leucêmica CCRF-CEM e suas sub-linhagens CEM/VM-1 (cedidas gentilmente por W.T. Beck, Dept. of Pharmacology, College of Medicine, University of Tennessee, Memphis, TN).

A 8226/Dox40 foi selecionada para resistência a doxorrubicina e mostra o fenótipo MDR clássico com super-expressão da glicoproteína P 170 (Pgp) [10]. A 8226/LR-5 foi selecionada para resistência a melfalano, proposta como sendo associada com níveis aumentados de GSH [11]. A U-

937-Vcr foi selecionada para resistência a vincristina, proposta como sendo associada à tubulina [12]. A H69AR, selecionada para resistência a doxorrubicina, expressa um fenótipo MDR proposto como sendo mediado por MRP [13]. A
5 CEM/VM-1, selecionada para resistência de teniposídeo, expressa uma MDR atípica, a qual é proposta como sendo associada a topoisomerase II (topo II) [14]. O mecanismo exato de resistência para a linhagem celular ACHB resistente não é conhecido e pode ser multifatorial [15].

10 As linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura completo descrito acima a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A 8226/Dox40 foi tratada uma vez por mês com doxorrubicina a 0,24 µg/ml e a 8226/LR-5 a cada troca do meio com melfalano a 1,53 µg/ml. A U-937-Vcr foi
15 cultivada continuamente na presença de 10 ng/ml de vincristina e a H69AR foi alternadamente alimentada com meio livre de fármaco e meio contendo 0,46 µg/ml de doxorrubicina. A linhagem celular CEM/VM-1 foi cultivada em meio livre de fármaco sem qualquer perda de resistência
20 por um período de 6-8 meses. Os padrões de resistência das linhagens celulares foram confirmados rotineiramente em experimentos de controle.

Células PC-3 de câncer de próstata humano foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville,
25 MD). Foram cultivadas em meio de Eagle modificado da Dulbecco suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina G e estreptomicina.

Tabela VIII - Linhagens celulares de tumor humano

Linhagem Celular	Origem	Agente selecionador	Resistência associada
CCRF-CEM	Leucemia		
CEM/VM-1	Leucemia	teniposídeo	topoisomerase II
ACHN	Câncer renal		resistência primária
NCI-H69	Câncer pulmonar de célula pequena		
H69AR	Câncer pulmonar de célula pequena	doxorrubicina	MRP
RPMI 8226/S	Mieloma		
8226/dox40	Mieloma	doxorrubicina	Pgp
8226/LR5	Mieloma	melfalano	glutaciona
U-937 GTP	Linfoma		
U-937-vcr	Linfoma	vincristina	tubulina
PC-3	Câncer de próstata		

Um meio completo consistindo no meio de cultura RPMI-1640 tamponado com carbonato (HyClone, Cramlington, UK) suplementado com FCS desativado 10%, glutamina 2 mM, 50 µg/ml de estreptomicina e 60 µg/ml de penicilina, foi utilizado para todas as linhagens celulares. FDA (Sigma, St. Louis, MO) foi dissolvido em DMSO e mantido congelado (-20°C) como uma solução estoque protegida da luz.

Os compostos de teste foram dissolvidos de acordo com a Tabela IX abaixo.

Tabela IX - Substâncias de teste

Copolímero	Quantidade agente (g)	PEG (g)	NaCl (9 ml/l) (g)	EtOH 95% (g)
L31	0,6	1,0		0,2
L121	0,6	1,0		0,2
F38	0,6		1,0	0,2
F127	5		4	1
F68	5		4	1
T1307	0,6	1,0		0,2
P105	0,6		1,2	
P84	0,6	1,0		0,2
F87	0,6		1,0	0,2
P123	0,6	1,0		0,2
F88	0,6	1,0		0,2

A parte principal da varredura primária foi realizada em uma primeira batelada de substâncias (F127 e F68) dissolvidas em cloreto de sódio e etanol apenas. Em vários experimentos a atividade foi comparada entre copolímeros dissolvidos em NaCl e etanol e dissolvidos em PEG e etanol, e não ocorreram diferenças significativas na potência. Por simplicidade, assumiu-se que a concentração da substância de teste em todos os frascos recebidos como sendo de 50% em peso. Diluições adicionais destas foram realizadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS; Sigma Aldrich) para soluções claras.

Células tumorais foram semeadas nas placas de 96 poços preparadas com o fármaco a uma densidade celular de cerca de 20000 células/poço.

Um ensaio de citotoxicidade em micro-cultivo fluorimétrico (FMCA) baseado na determinação da fluorescência gerada a partir da hidrólise de FDA a fluoresceína por células com membranas plasmáticas intactas e como previamente descrito em detalhes [16] foi utilizado. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ por 72 horas. Ao final do período de incubação, as placas foram centrifugadas (1000 rpm, 5 minutos) e o meio foi removido por aspiração. Após uma lavagem em PBS, foram adicionados 100 µl/poço de FDA dissolvido em um tampão fisiológico (10 µg/ml). As placas foram incubadas por 45 minutos e a fluorescência gerada por cada poço foi determinada em um fluorômetro de varredura de 96 poços (Fluoroscán II, Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia). A fluorescência é proporcional ao número de células intactas no poço.

Os critérios de qualidade para uma análise de sucesso incluíram um sinal de fluorescência nos poços de controle de mais de cinco vezes o valor do branco médio, um coeficiente médio da variação (CV) nos poços de controle de menos de 30% e mais de 70% de células tumorais na preparação celular antes da incubação. Os experimentos foram realizados duas vezes, os valores médios foram utilizados.

A sobrevivência celular é apresentada como índice de sobrevivência (SI), definido como a fluorescência nos poços experimentais em percentagem em relação aos poços de controle, com valores dos poços de branco subtraídos. Todos os experimentos de linhagem celular foram realizados

pelo menos duas vezes, e todos os dados foram incluídos na análise.

Os dados de experimentos de painel de linhagem celular foram comparados com uma base de dados contendo dados de
5 mais de 150 diferentes compostos incluindo os agentes citotóxicos utilizados mais comuns. Para este propósito, um IC50 foi calculado para cada fármaco e cada linhagem celular, definido como a concentração do fármaco incluindo um índice de sobrevivência de 50% utilizando-se regressão
10 log-linear simples. O conjunto de dez valores de IC50 para cada fármaco foi correlacionado utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson com o correspondente conjunto de dados de outros fármacos na base de dados. A partir destes IC50s um padrão de atividade foi também apresentado
15 utilizando Delta, definido como o desvio do log de IC50 de uma linhagem celular do log médio de IC50 no painel de linhagem celular. Estes cálculos foram realizados de acordo com Dhar *et al.* [3], modificados a partir dos procedimentos utilizados no National Cancer Institute
20 (www.dtp.nci.nih.gov).

Os dados de concentração-efeito de ambos os painéis de linhagem celular foram ajustados para uma equação dose-resposta sigmoideal com inclinação variável, utilizando-se a regressão não linear no programa GraphPad Prism (GraphPad
25 Software, San Diego, CA). Os valores 0 e 100% de sobrevivência celular foram estabelecidos como o efeito máximo e a linha de base, respectivamente, e o EC50 (concentração produzindo 50% de efeito) foi previsto pelo ajuste da curva. Os fatores de resistência foram calculados

como a razão entre o EC50 na linhagem celular resistente e na parental nos pares de linhagem celular [3].

Os compostos mantiveram sua atividade citotóxica após 4 semanas de armazenamento em placas micro-título a -70°C .

5 As curvas concentração-efeito foram similares quando se utilizou placas que foram armazenadas por 4 semanas e quando se utilizou placas preparadas recentemente (não mostrado).

As curvas concentração-efeito para todos os compostos testados em U937gtb são mostradas na Fig. 11. Os
10 respectivos copolímeros testados são individualmente mostrados nas Figs. 12A a 12O. Os valores de IC50 são mostrados na Tabela X abaixo. Quando as amostras dissolvidas em NaCl/EtOH e PEG/NaCl/EtOH foram comparadas, foram obtidos resultados similares (não mostrado).

15

Tabela X - Valores de IC50 para os copolímeros

Copolímero	IC50 (% em peso)
L31	0,042
T1307	0,0085
F38	0,35
P84	0,045
P105	0,053
L121*	0,0029
F68	1,7
F127	0,0037
F87	0,094
P123	0,0067
F88	0,13

* L121 precipitou na diluição em PBS produzindo uma suspensão leitosa, considerada adequadamente homogênea para o teste.

Novamente, os resultados confirmam que o copolímero PLURONIC[®] com um teor hidrofílico médio de cerca de 80% apresenta de longe o efeito anti-câncer mais baixo. O EC50 para todas as linhagens celulares são apresentados na Tabela XI para os três copolímeros mais efetivos selecionados da Tabela X. As Figs. 13A a 13C são representações gráficas dos resultados.

Tabela XI - Atividade EC50 no painel de linhagem celular

Linhagem celular	F127 (% p/p)	P84 (% p/p)	L121 (% p/p)
CCRF-CEM	>1	0,022	0,0018
CEM/VM-1	>1	0,0020	0,0020
ACHN	0,0095	0,00091*	0,0019
NCI-H69	>1	0,0018	0,00061*
H69AR	0,0028	0,00003*	<<0,0016*
RPMI 8226/S	0,017	0,00075*	<<0,0016*
8226/dox40	0,078	0,0014	<<0,0016*
8226/LR5	0,024	0,0015	0,00012*
U-937 GTP	0,0011	0,0012	0,00012*
U-937-vcr	0,0032	0,0011	0,00012*
PC-3	0,027	0,00076*	<<0,0016*

10 * Valor aproximado, ajuste da curva não possível.

As substâncias foram testadas até um mínimo de concentração de 0,0016% em peso. O valores de EC50 abaixo disto são estimados a partir da análise da regressão linear permitindo a extrapolação da curva. Quando o ajusta da curva era inadequado e uma maioria das células foi morta

quando se utilizou a concentração mais baixa de EC50 <<0,0016.

Será entendido por um especialista na técnica que várias modificações e alterações podem ser realizadas na presente invenção sem que se afastem de seu escopo, o qual é definido pelas reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

- [1] US 2001/0051659 A1
- 10 [2] Silk et al., *Cancer* 1972, 29, 171-172
- [3] Dhar et al., *Br. J. Câncer.* 1996, 74, 888-896
- [4] Alley et al., *Cancer Res.* 1988, 48, 589-601
- [5] Paull et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 81, 1088-1092
- [6] Dhar et al., *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 346, 315-322
- 15 [7] Fisher et al., *Eur. J. Cancer* 1996, 32A, 1082-1088
- [8] Fridborg et al., *Eur. J. Cancer* 1999, 35, 424-432
- [9] Valeriote et al., *Cancer Chemother. Rep.* 1975, 59, 895-900
- [10] Dalton et al., *Cancer Res.* 1986, 46, 5125-5130
- [11] Bellamy et al., *Cancer Res.* 1991, 51, 995-1002
- 20 [12] Botling et al., *Int. J. Cancer* 1994, 58, 269-274
- [13] Cole et al., *Science* 1992, 258, 1650-1654
- [14] Danks et al., *Biochemistry* 1988, 27, 8861-8869
- [15] Nygren et al., *Biosci. Rep.* 1990, 10, 231-237
- [16] Larsson et al., *Int. J. Cancer* 1992, 50, 177-185
- 25 [17] Freireich et al., *Cancer Chemother. Rep.* 1966, 50, 219-244
- [18] WO 98/07434
- [19] Kabanov et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 54, 759-779

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um copolímero em bloco anfifílico apresentando uma cadeia polimérica hidrofóbica central com
5 uma primeira extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica e uma segunda extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica como agente quimioterapêutico **caracterizado** pelo fato de ser na
10 fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de câncer, desde que o dito câncer não seja câncer do cólon ou câncer do reto, onde um teor médio do dito óxido de etileno constitui menos de 80% do dito copolímero em bloco anfifílico e o dito medicamento compreende o dito
15 copolímero em bloco anfifílico ou uma mistura de pelo menos dois copolímeros em bloco anfifílicos como agentes quimioterapêuticos.

2. Uso de um copolímero em bloco anfifílico
20 apresentando uma cadeia polimérica hidrofóbica central com uma primeira extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica e uma segunda extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica,
25 **caracterizado** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para a redução de uma taxa de crescimento de células cancerígenas em um indivíduo que sofre de câncer, desde que o dito câncer não seja câncer do cólon ou câncer do reto, onde o teor médio do dito óxido de etileno
30 constitui menos de 80% do dito copolímero em bloco

anfifílico e o dito medicamento compreende o dito copolímero em bloco anfifílico ou uma mistura de pelo menos dois copolímeros em bloco anfifílicos como os únicos agentes redutores da taxa de crescimento.

5

3. Uso de um copolímero em bloco anfifílico apresentando uma cadeia polimérica hidrofóbica central com uma primeira extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica e uma
 10 segunda extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica, **caracterizado** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento anti-proliferação de célula, desde que a dita célula não seja uma célula de câncer do cólon ou célula de
 15 câncer do reto, onde o teor médio do dito óxido de etileno constitui menos de 80% do dito copolímero em bloco anfifílico e o dito medicamento compreende o dito copolímero em bloco anfifílico ou uma mistura de pelo menos dois copolímeros em bloco anfifílicos como os únicos
 20 agentes anti-proliferação de célula.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato do copolímero em bloco anfifílico ser representado pela fórmula (I):

25



onde m, n e p são números integradores.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de m, n e p serem selecionados de tal forma que

$$\frac{44x(n+p)}{44x(n+p)+58xm} < 0,8.$$

5

6. Uso de acordo com as reivindicações 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de n ser igual a p.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações
10 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de um teor de óxido de etileno médio do dito copolímero em bloco anfifílico ser de pelo menos 40% em peso, mas abaixo de 80% em peso.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações
15 4 a 6, **caracterizado** pelo fato de um teor de óxido de propileno médio do dito copolímero em bloco anfifílico ser de pelo menos 2000 g/mol.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado**
20 pelo fato do dito teor de óxido de propileno médio ser de pelo menos 3000 g/mol.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9,
caracterizado pelo fato do dito teor de óxido de propileno
25 médio ser em uma faixa de 3500 a 4500 g/mol, preferivelmente cerca de 4000 g/mol.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações
1 a 10, **caracterizado** pelo fato do dito copolímero em bloco

anfifílico apresentar um peso molecular médio de 12600g/mol, um teor de óxido de etileno médio de 73,2 ± 1,7% e um ponto de fusão de 56°C.

5 12. Uso de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato do dito câncer ser selecionado de um grupo consistindo em câncer renal, câncer pulmonar, mieloma, linfoma e câncer da próstata.

10 13. Método *in vitro* para a modulação da taxa de proliferação de uma célula, desde que a dita célula não seja uma célula de câncer do cólon ou uma célula de câncer do reto, **caracterizado** pelo fato de compreender o contato da dita célula com um copolímero em bloco anfifílico
15 apresentando uma cadeia polimérica hidrofóbica central com uma primeira extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica e uma segunda extremidade conectada a pelo menos uma cadeia polimérica lateral de óxido de etileno hidrofílica, onde o
20 teor médio do dito óxido de etileno constitui menos de 80% do dito copolímero em bloco anfifílico.

 14. Método de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato da dita célula ser uma célula
25 cancerígena, mas não uma célula de câncer do cólon ou uma célula de câncer do reto.

DESENHOS

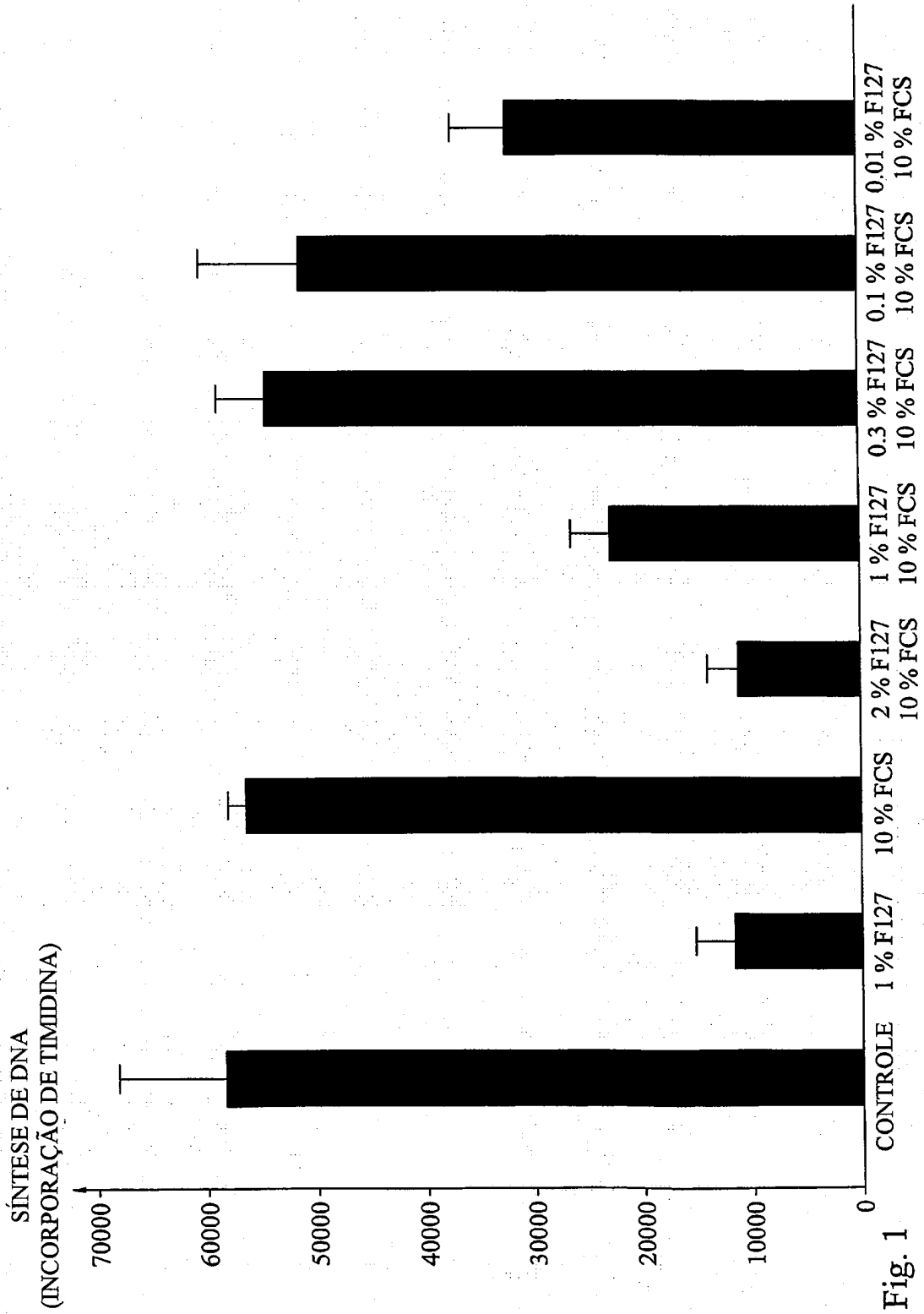


Fig. 1

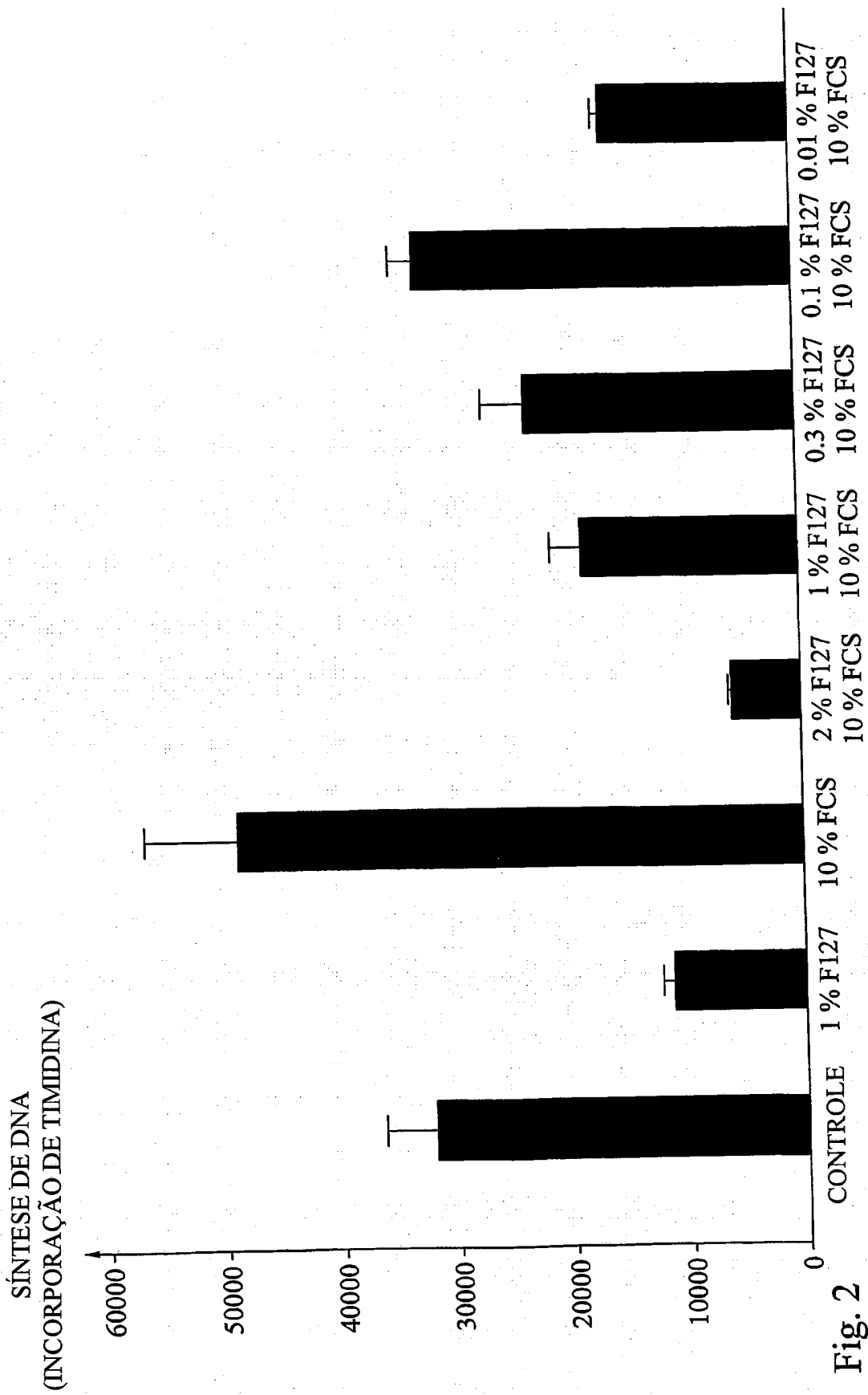


Fig. 2

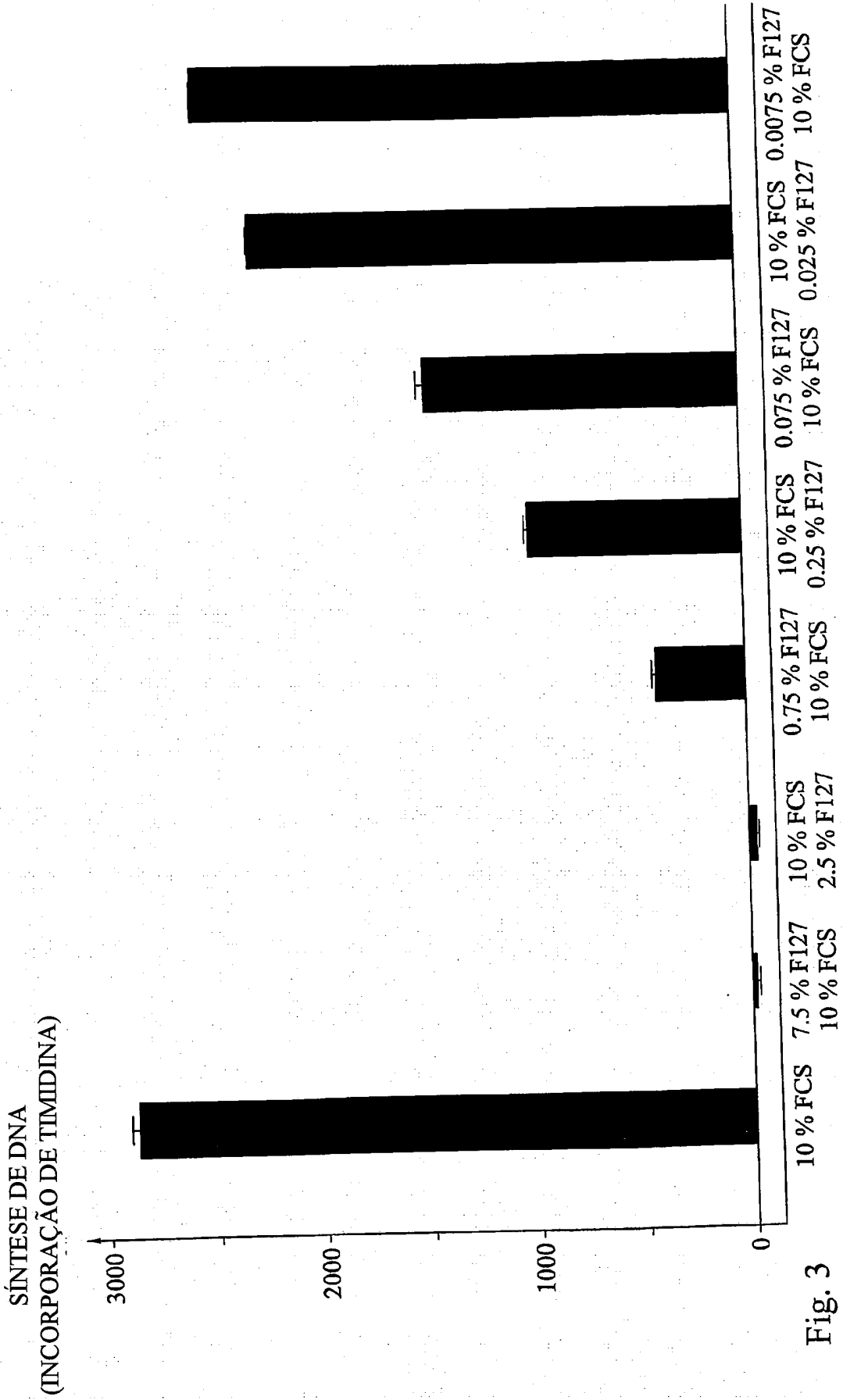


Fig. 3

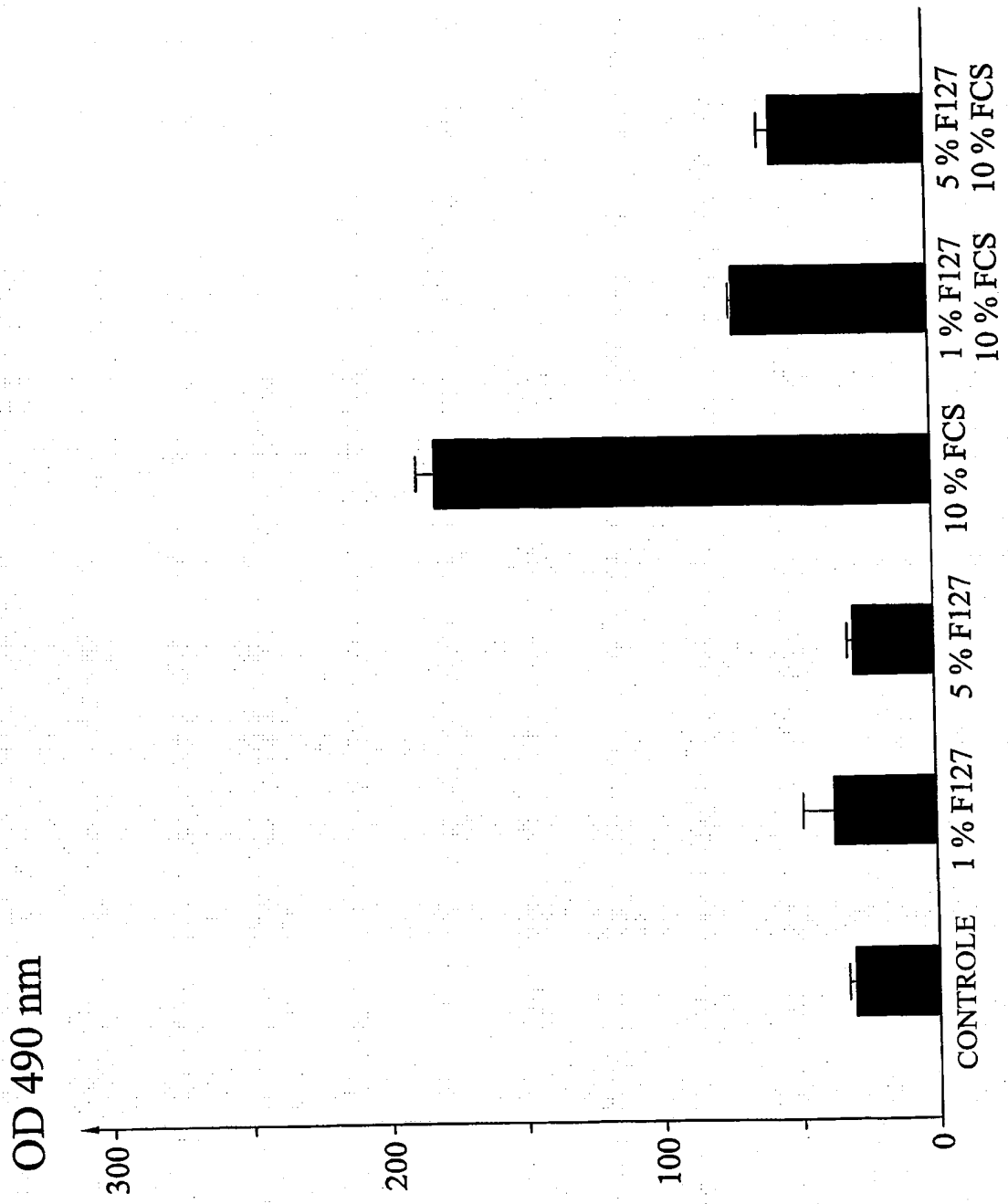


Fig. 4

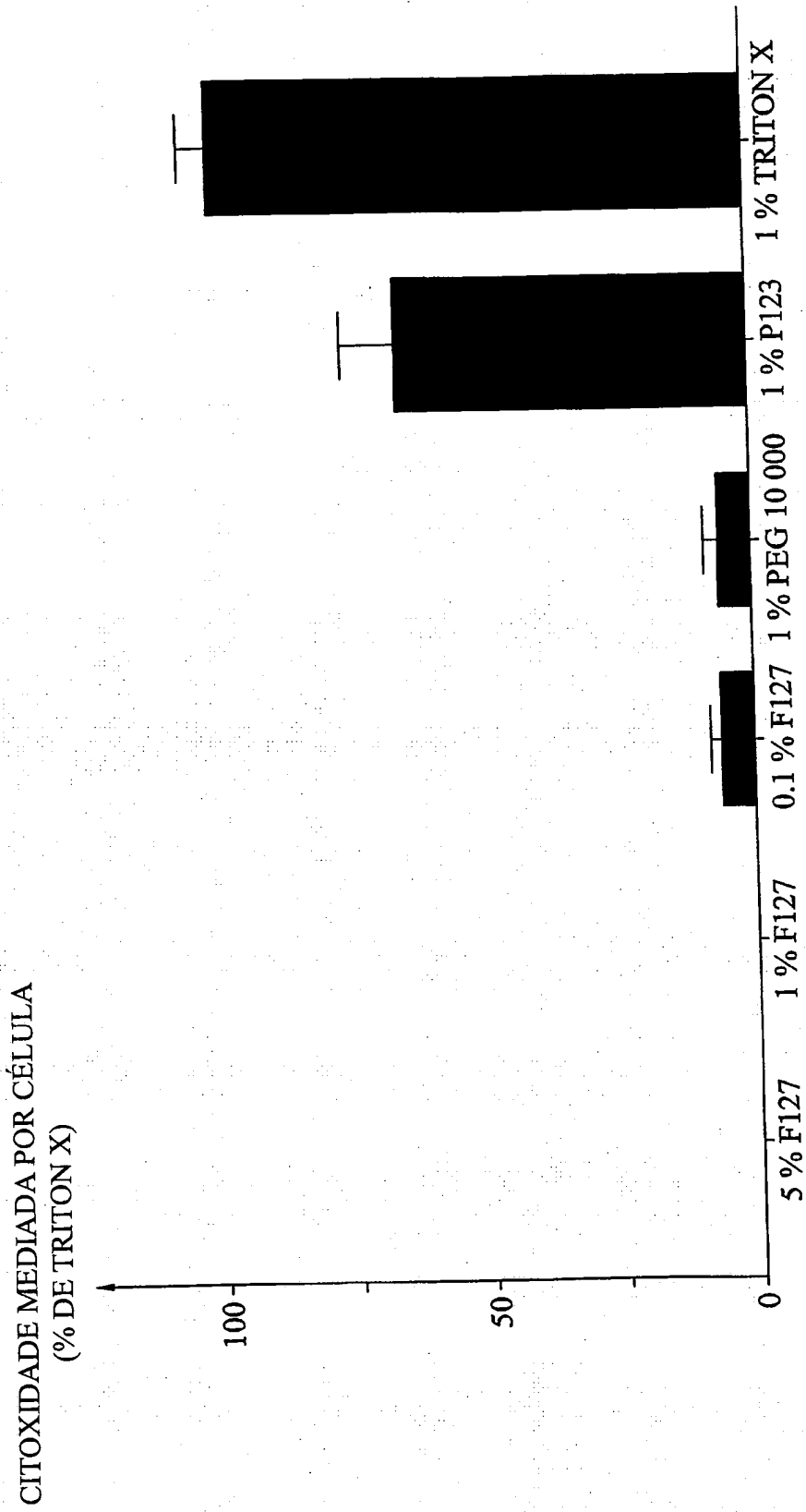


Fig. 5

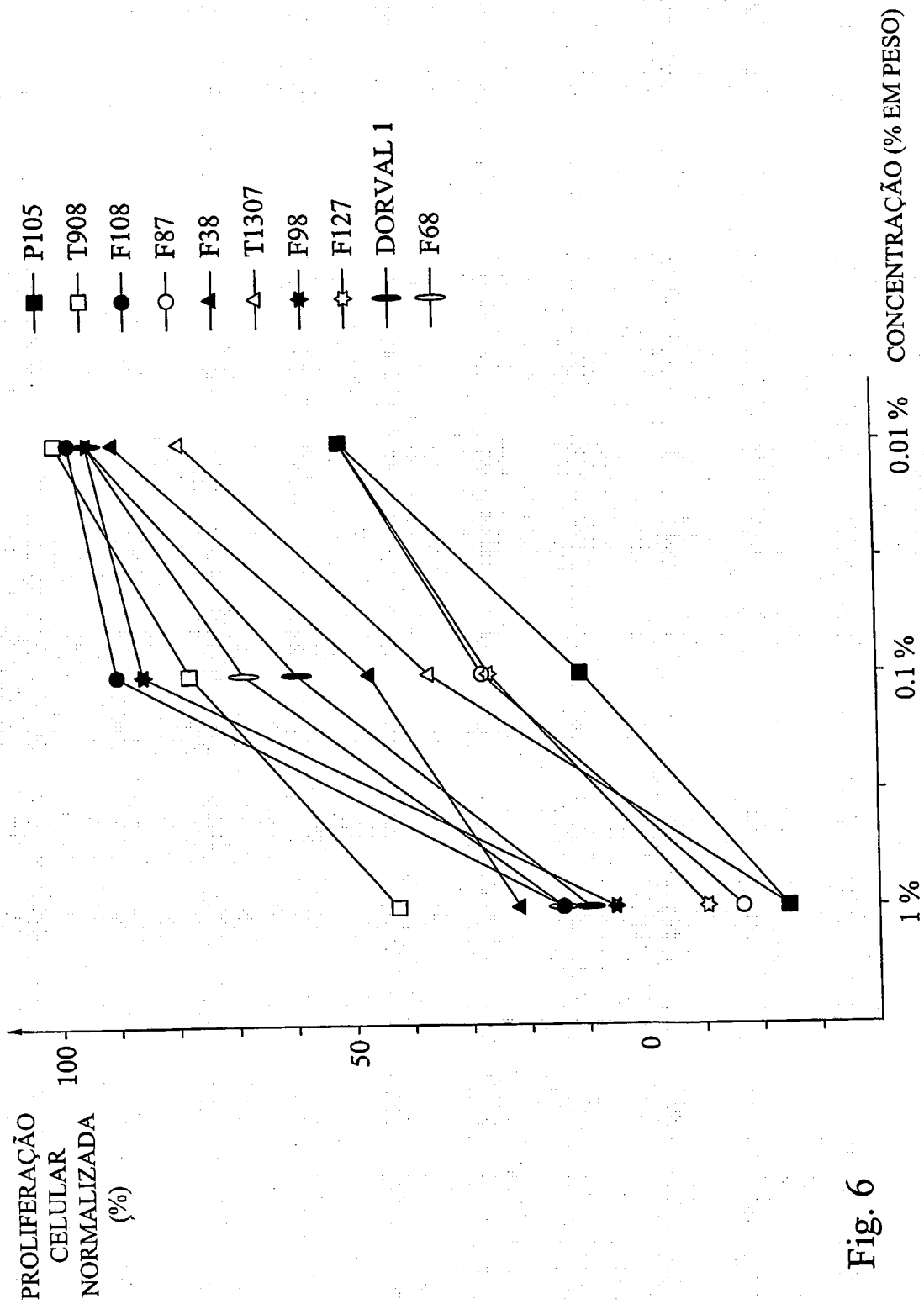


Fig. 6

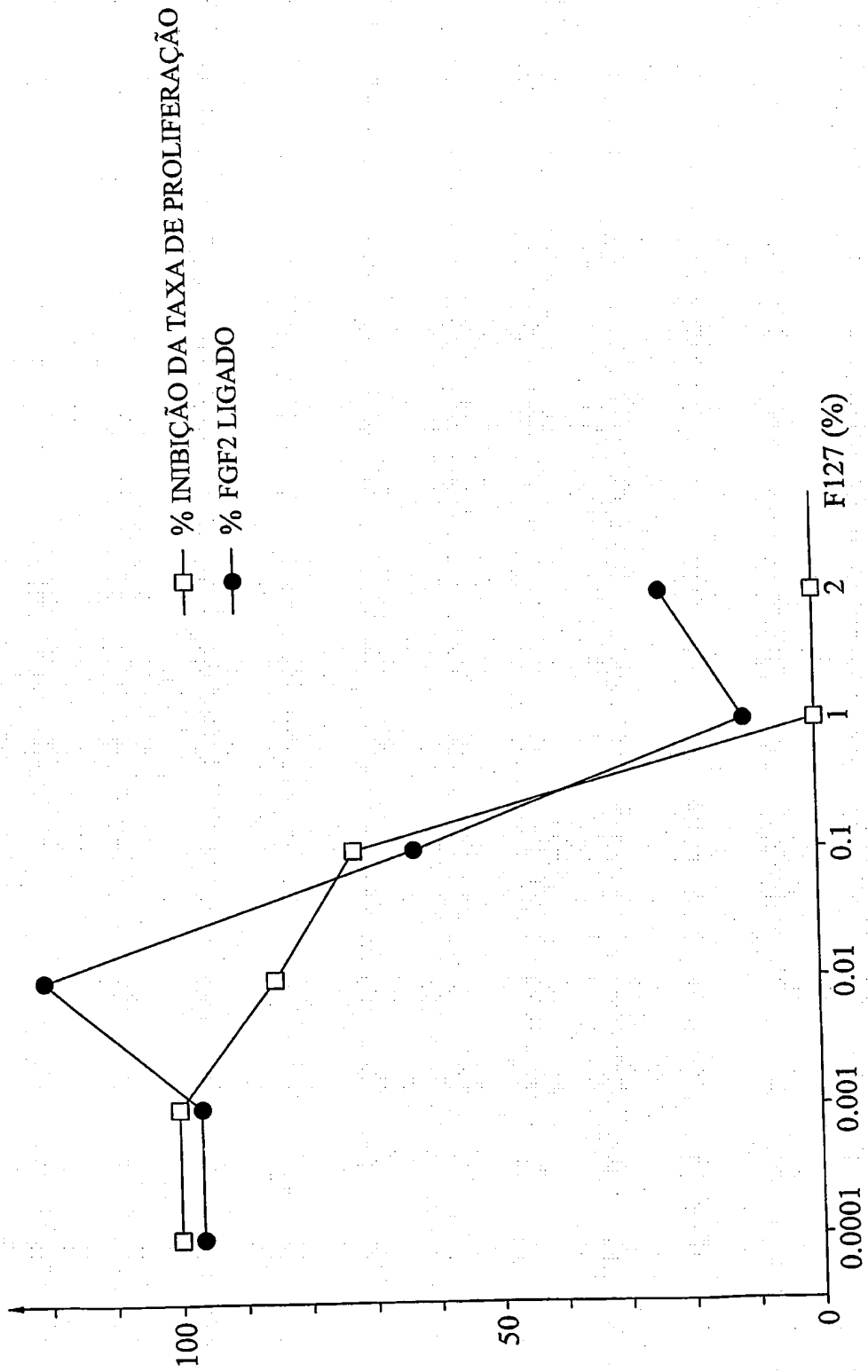


Fig. 7

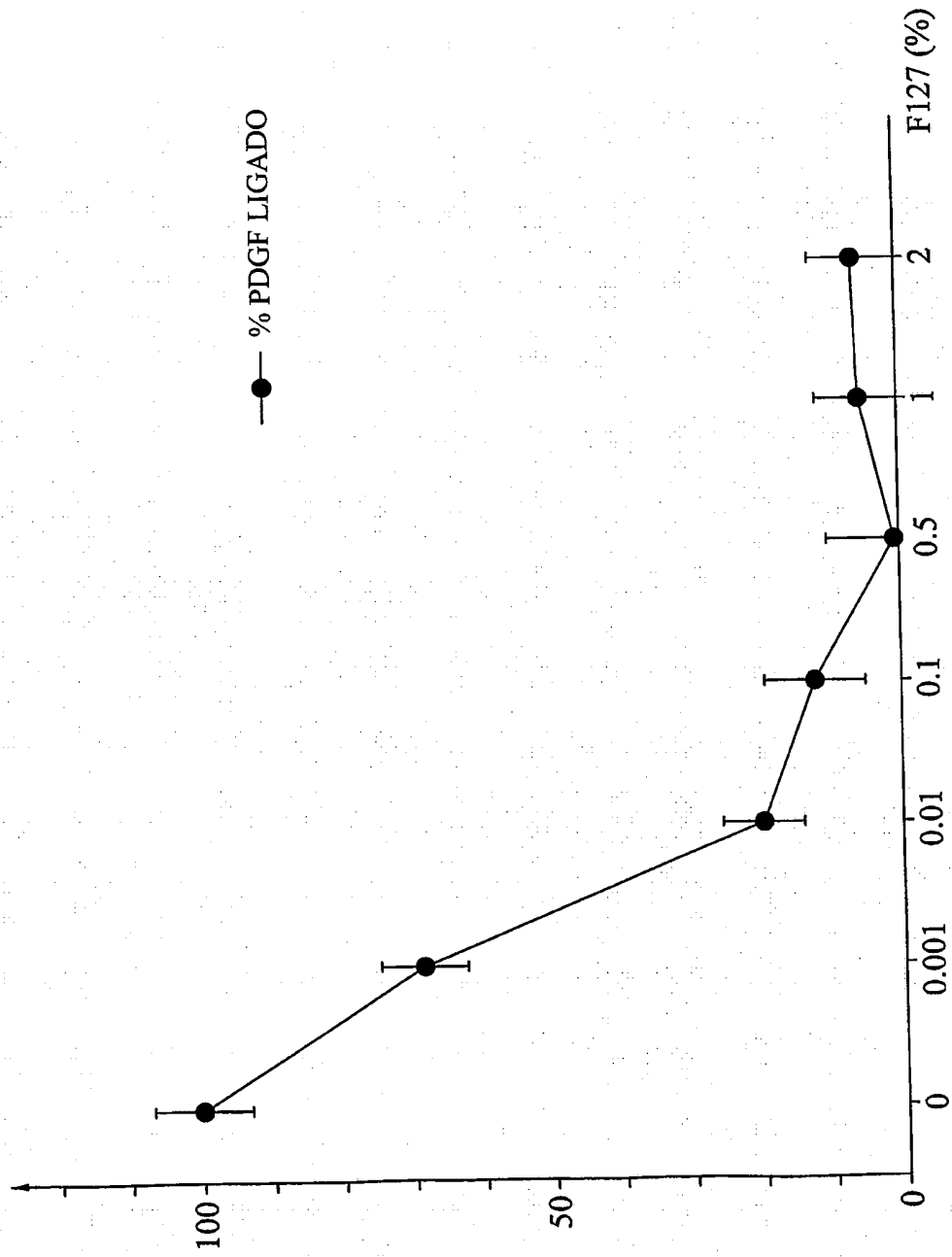


Fig. 8

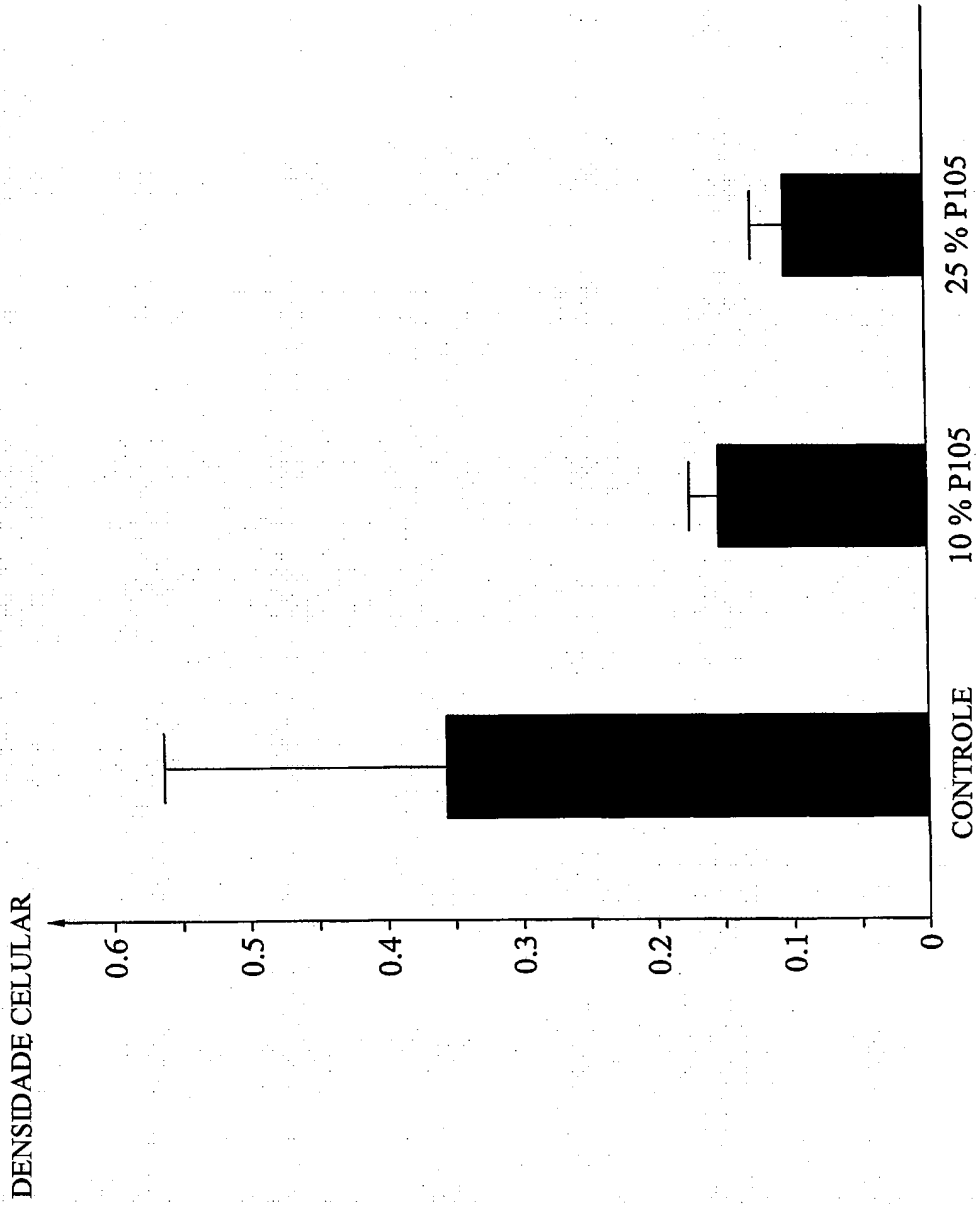


Fig. 9

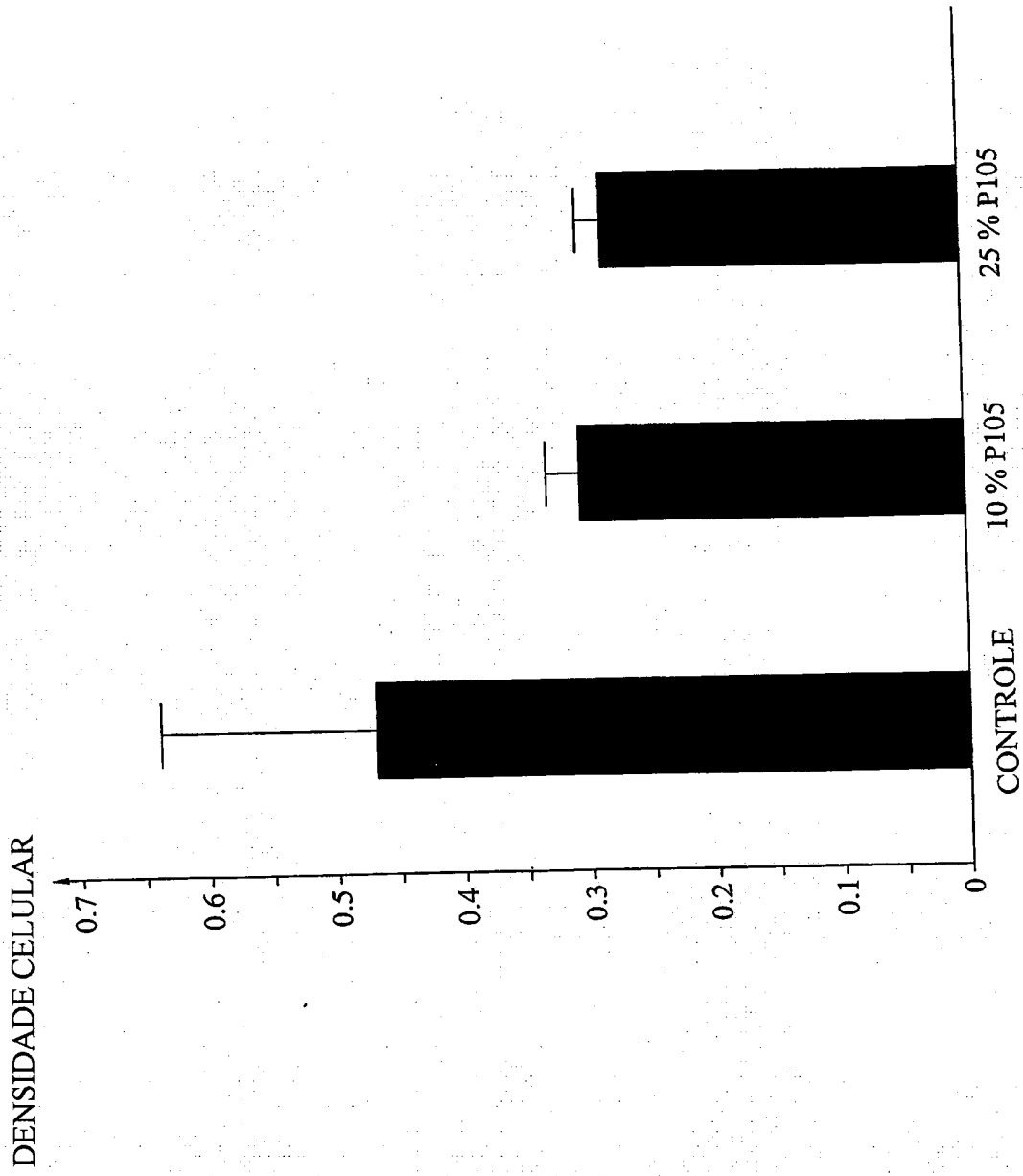


Fig. 10

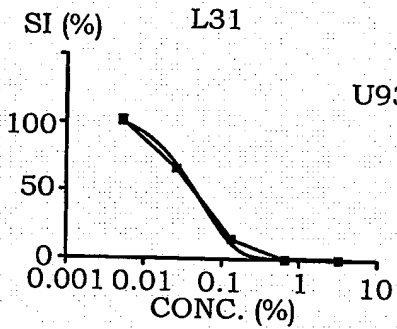
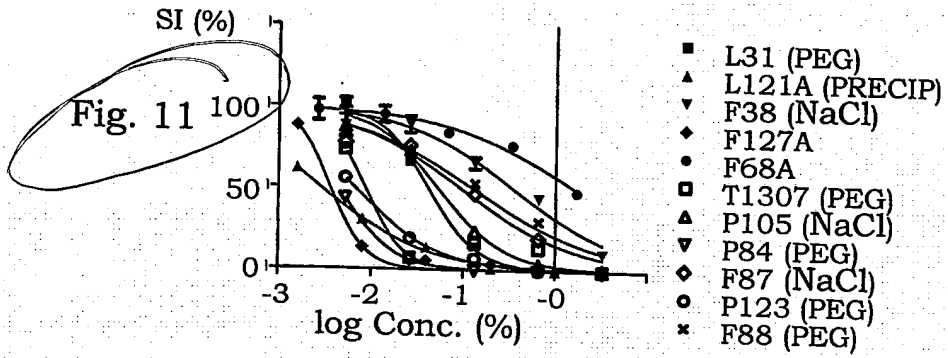


Fig. 12A

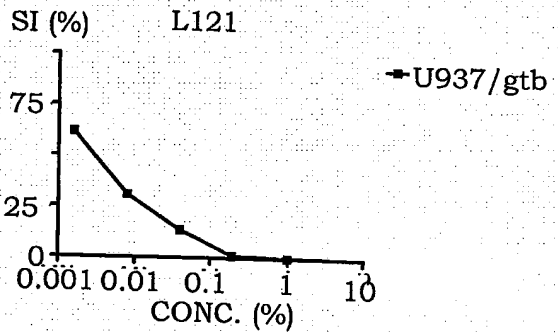


Fig. 12B

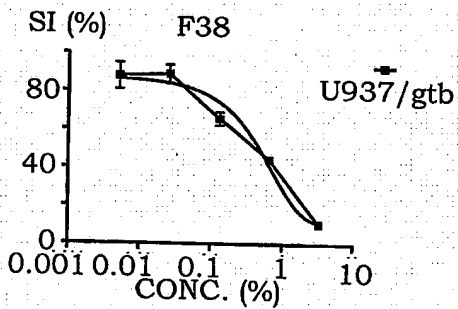


Fig. 12C

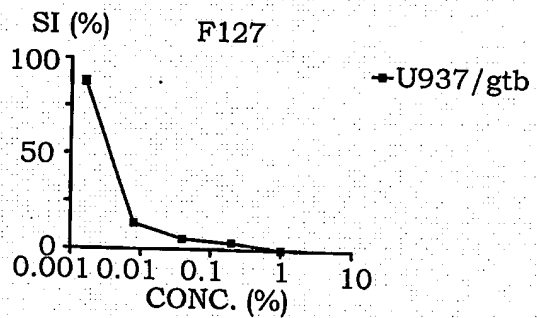


Fig. 12D

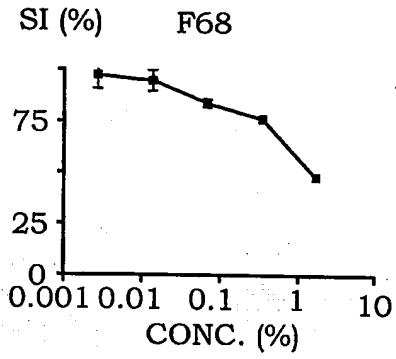


Fig. 12E

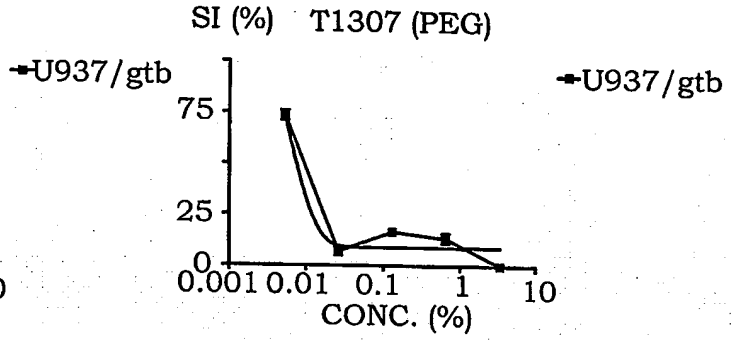


Fig. 12F

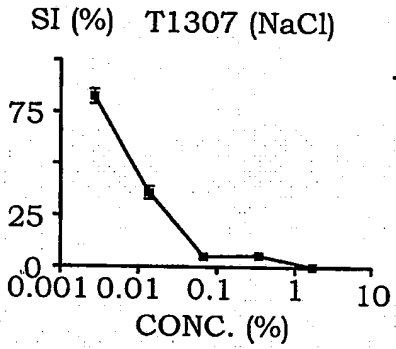


Fig. 12G

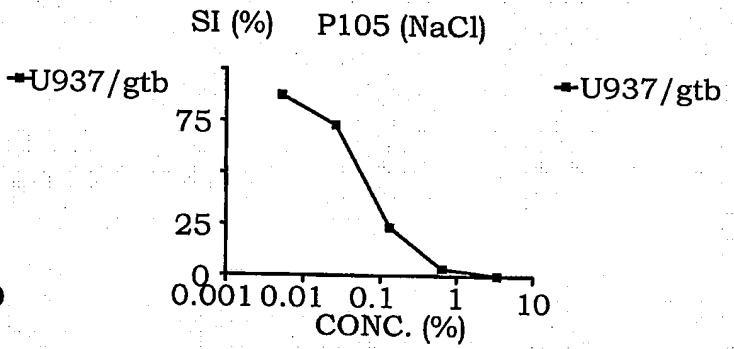


Fig. 12H

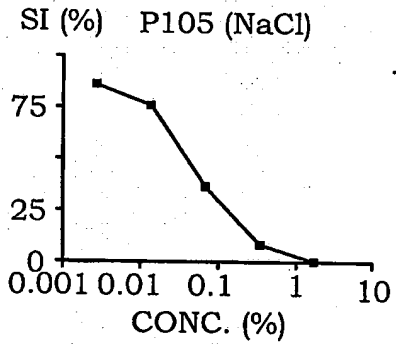


Fig. 12I

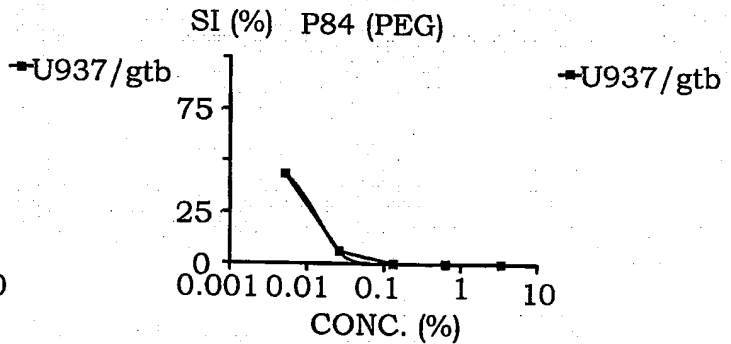


Fig. 12J

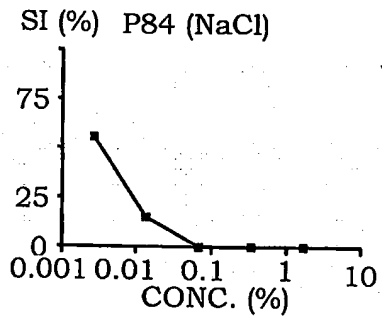


Fig. 12K

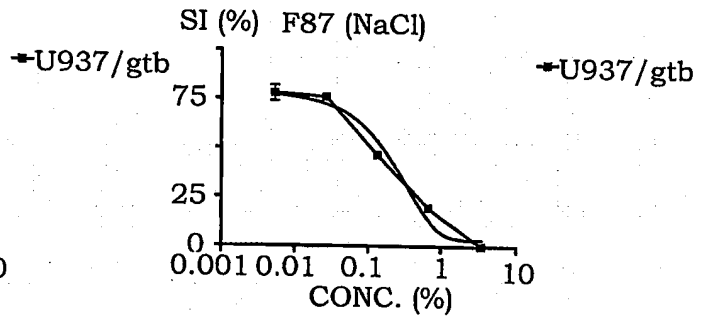


Fig. 12L

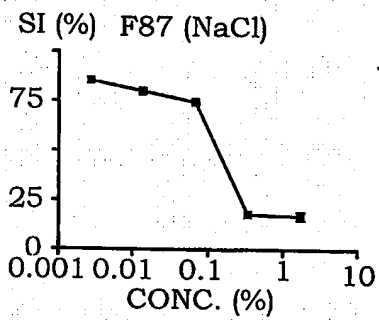


Fig. 12M

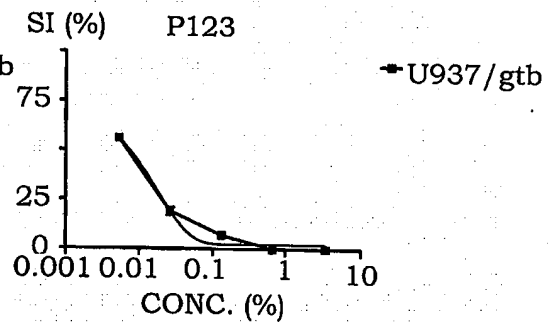


Fig. 12N

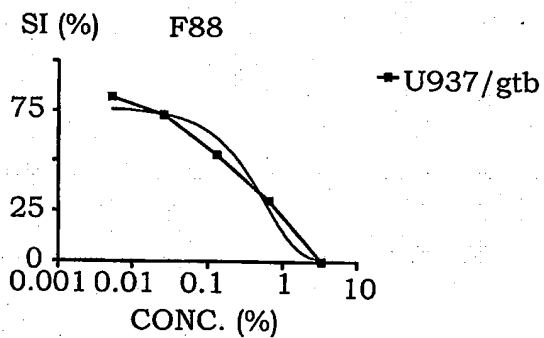


Fig. 12O

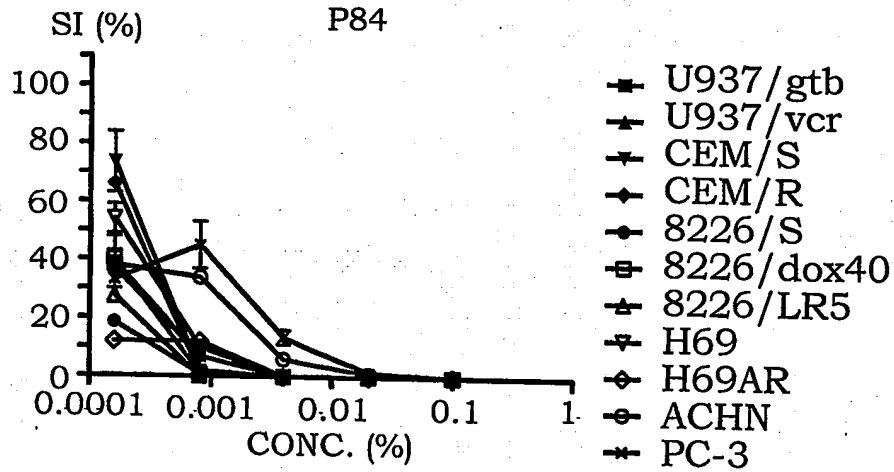


Fig. 13A

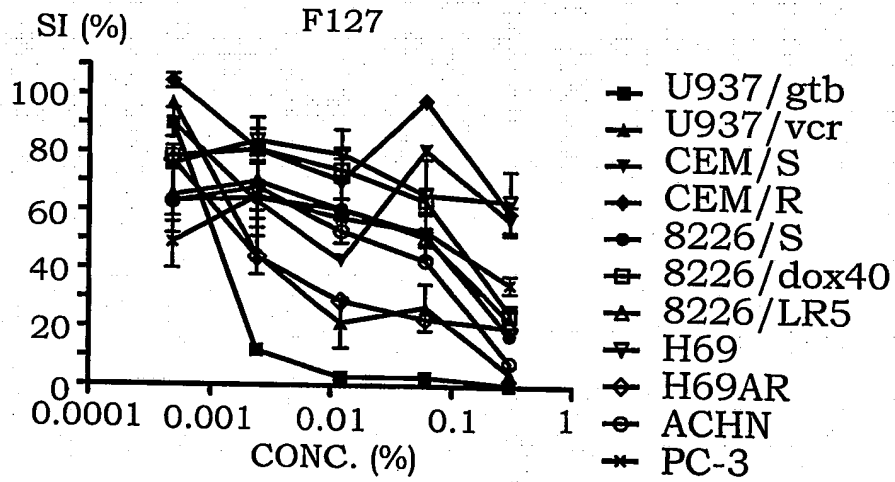


Fig. 13B

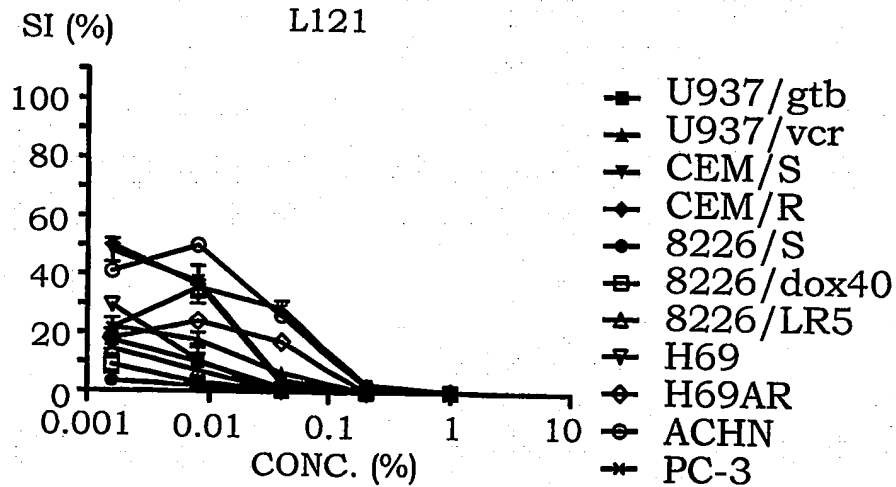


Fig. 13C

RESUMO**AGENTES ANTI-CÂNCER A BASE DE POLÍMERO**

5 A presente invenção refere-se ao uso de copolímeros em bloco anfifílicos para o tratamento e prevenção de câncer, e em particular pela redução da taxa de proliferação de células cancerígenas. Os copolímeros em bloco preferidos compreendem uma cadeia hidrofóbica
10 central, preferivelmente uma cadeia de óxido de polipropileno, à qual pelo menos duas cadeias laterais hidrofílicas, preferivelmente cadeias de óxido de polietileno, estão conectadas.