



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

(11) BR 112014022123-5 B1



(22) Data do Depósito: 06/03/2013

(45) Data de Concessão: 20/09/2022

(54) Título: USO DE UMA COMBINAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: A61K 31/05; A61K 31/175; A61K 31/4172; A61K 31/4192; A61K 31/495; (...).

(30) Prioridade Unionista: 06/03/2012 US 61/607,103.

(73) Titular(es): VANQUISH ONCOLOGY, INC.; THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY; THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS.

(72) Inventor(es): PAUL J. HERGENROTHER; RACHEL C. BOTHAM; TIMOTHY M. FAN; MARK J. GILBERT; MICHAEL K. HANDLEY; AVADHUT JOSHI; GREGORY J. RIGGINS; THEODORE M. TARASOW.

(86) Pedido PCT: PCT US2013029391 de 06/03/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/134398 de 12/09/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/09/2014

(57) Resumo: TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE PROCASPASE PARA GLIOBLASTOMA. A presente invenção refere-se a composições e métodos para indução da morte de células, por exemplo, morte de células de câncer. Combinações de compostos e métodos relacionados ao uso são descritos, incluindo o uso de compostos em terapia para o tratamento de câncer e indução seletiva de apoptose em células. As combinações de fármacos descritas podem ter efeitos de neurotoxicidade mais baixos do que outros compostos e combinações de compostos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE UMA COMBINAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER**".

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] A presente invenção refere-se ao pedido que reivindica prioridade sob 35 U.S.C. §119(e) para o Pedido de Patente Provisória U.S. No. 61/607.103, depositado no dia 6 de março de 2012, que está incorporado aqui por referência.

[002] Apoptose, ou morte celular programada, desempenha um papel central no desenvolvimento e homeostase de todos os organismos multicelulares. Uma marca frequente do câncer é a resistência aos sinais apoptóticos naturais. Dependendo do tipo de câncer, essa resistência é tipicamente devido a sobre- ou infra-regulação de proteínas chaves na cascata apoptótica ou às mutações em genes codificando essas proteínas. Tais mudanças ocorrem em ambas, na via apoptótica intrínseca, que afunila através de mitocôndria e caspase-9, e a via apoptótica extrínseca, que envolve a ação de receptores da morte e caspase-8. Por exemplo, alterações nos próprios níveis de proteínas tais como p53, Bim, Bax, Apaf-1, FLIP e muitas outras têm sido observadas em cânceres. As alterações podem levar a uma cascata apoptótica defeituosa, uma em que o sinal pró-apoptótico a montante não é adequadamente transmitido para ativar as caspases executoras, caspase-3 e caspase-7.

[003] Como a maioria das vias apoptóticas, em última análise, envolvem a ativação de procaspase-3, a montante de anormalidades genéticas são efetivamente "pausas" no circuito apoptótico, e como um resultado tais células proliferam atipicamente. Dado o papel central de apoptose em câncer, esforços têm sido feitos para desenvolver terapias que alvejam proteínas específicas na cascata apoptótica. Por exemplo, aglutinantes peptídicos ou de moléculas pequenas para membros de cascata, tais como p53 e proteínas da

família Bel ou para o inibidor de apoptose (IAP) da família de proteínas têm atividade pró-apoptótica, como fazem os compostos que promovem a oligomerização de Apaf-1. Entretanto, porque tais compostos alvejam posições iniciais (ou de intermediárias até altas) na cascata apoptótica, cânceres com mutações afetando proteínas à jusante daqueles membros podem ainda ser resistentes aos possíveis efeitos benéficos desses compostos.

[004] Seria vantajoso, para fins terapêuticos, identificar moléculas pequenas que diretamente ativam uma proteína pró-apoptótica de longe, a jusante na cascata apoptótica. Esta abordagem poderia envolver uma posição relativamente baixa na cascata, desse modo possibilitando matar até aquelas células que têm mutações que afetam a montante o mecanismo apoptótico. Além do mais, tais estratégias terapêuticas teriam uma probabilidade maior de sucesso se aquela proteína pró-apoptótica fosse sobrerregulada ou presente em níveis maiores nas células de câncer. Desse modo, a identidade de moléculas pequenas que alvejam a proteína do efetor a jusante de apoptose, procaspase-3, estaria significativamente ajudando a terapia de câncer atual.

[005] A conversão ou ativação de procaspase-3 para caspase-3 resulta na geração da forma de caspase "executora" que subsequentemente catalisa a hidrólise de um grande número de substratos de proteína. A caspase-3 ativa é um homodímero de heterodímeros e é produzida por proteólise de procaspase-3. *In vivo*, esta ativação proteolítica tipicamente ocorre através da ação de caspase-8 ou caspase-9. Para garantir que o zimogênio (pró-enzima) não é prematuramente ativado, a procaspase-3 tem uma "armadilha de segurança" de 12 aminoácidos, que bloqueia o acesso ao sítio de ETD (sequência de aminoácidos, ile-glu-thr-asp) de proteólise. Essa armadilha de segurança possibilita a procaspase-3 resistir à ativação auto-catalítica e a proteólise por caspase-9. Estudos mutagênicos indicam que três resíduos de ácido aspár-

tico consecutivos parecem ser os componentes críticos da armadilha de segurança. A posição da armadilha de segurança é sensível ao pH, desse modo, mediante acidificação celular (como ocorre durante a apoptose) acredita-se que a armadilha de segurança permite acesso ao sítio de proteólise, e a caspase-3 ativa pode ser produzida pela ação de caspase-9 ou através de um mecanismo de autoativação.

[006] Em certos cânceres, os níveis de procaspase-3 são elevados em relação ao tecido normal. Um estudo de isolados primários de pacientes de câncer de cólon revelou que, em média, procaspase-3 foi sobrerregulada seis vezes em tais isolados em relação ao tecido não canceroso adjacente. Além disso, a procaspase-3 é sobrerregulada em certos neuroblastomas, linfomas, e cânceres de fígado. Além do mais, uma avaliação sistemática foi realizada dos níveis de procaspase-3 no painel de 60 linhas de células usado para varredura de câncer pelo Programa de Terapia Evolucionária do National Cancer Institute (Instituto Nacional de Câncer) (NCI), que revelou que certos cânceres de pulmão, melanoma, renal, e mama mostram níveis grandemente intensificados de expressão de procaspase-3.

[007] Devido ao papel de caspase-3 ativa na realização de apoptose, os níveis relativamente altos de procaspase-3, em certos tipos de células cancerosas, e a intrigante supressão mediada por armadilha de segurança de sua autoativação, moléculas pequenas que diretamente modificam a procaspase-3 poderiam ter grande aplicabilidade na terapia de câncer alvejado.

[008] A terapia de combinação tem se tornado padrão para o tratamento de pacientes de câncer. O objetivo dos regimes de coquetel de fármacos da terapia de combinação é realizar um efeito sinérgico ou aditivo entre quimioterapêuticos, desse modo proporcionando tempos mais curtos de tratamento, diminuindo a toxicidade, e aumentando a sobrevivência do paciente. Fármacos, que atuam em uma única via

bioquímica, são particularmente candidatos fortes para sinergia ou potencialidade, pois eles podem imitar as combinações genéticas "letais sintéticas". Por exemplo, inibidores de poli(ADP-ribose)polimerase-1 (PARP-1), uma enzima que facilita reparos de danos de DNA, potencialmente tem sinergia com agentes que danificam o DNA, como demonstrado em cultura de célula, modelos animais, e testes clínicos em seres humanos. Entretanto, existe ainda uma necessidade de terapias mais eficazes para o tratamento de muitas formas de câncer, e novas combinações sinérgicas de fármacos anticâncer ajudariam este segmento. Conseqüentemente, existe uma necessidade de identificar novos agentes citotóxicos que são eficazes para matar células de câncer, protegendo ainda os tecidos normais do hospedeiro da toxicidade indesejável do agente citotóxico.

SUMÁRIO

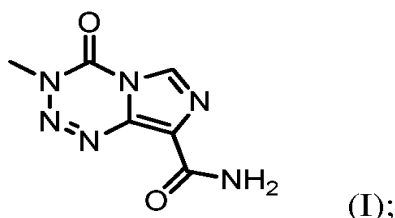
[009] A invenção largamente provê compostos, composições, e métodos de tratamento terapêutico. Em várias modalidades, as invenções são aplicáveis a uma variedade de doenças de câncer e tipos de células de câncer tais como mama, linfoma, adrenal, renal, melanoma, leucemia, neuroblastoma, pulmão, cérebro, e outros conhecidos na técnica. Aqui são descritos, inter alia, composições e métodos incluindo moléculas pequenas capazes de induzir a morte da célula. Em algumas modalidades, as composições e métodos envolvem compostos que podem interagir diretamente ou indiretamente com membros da via de morte celular programada tal como procaspase-3. Em certas modalidades, as composições e métodos têm neurotoxicidade reduzida em comparação a outros compostos que interagem, diretamente ou indiretamente, com membros da via de morte celular programada tais como procaspase-3.

[0010] A terapia de combinação anticâncer pode consistir de fármacos que alvejam diferentes vias bioquímicas, ou aqueles que atin-

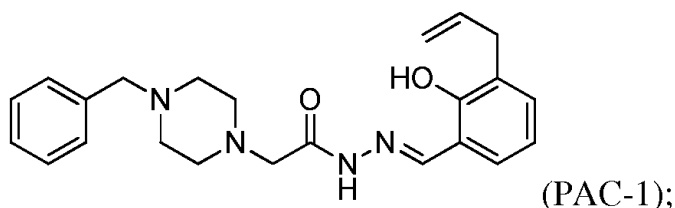
gem diferentes alvos na mesma via, imitando combinações genéticas "sintéticas letais". A combinação do ativador de procaspase-3 PAC-1 e o agente alquilante temozolomida (TMZ) mostra considerável sinergia no sentido de induzir a morte apoptótica de células de câncer para um grau excedendo bem o efeito aditivo. A combinação de PAC-1 e TMZ eficazmente reduz o peso do tumor em modelos de tumor em que os compostos sozinhos têm mínimo ou nenhum efeito. Esses dados indicam a eficácia da combinação de PAC-1/TMZ para o tratamento de câncer e, mais amplamente, mostram que essa combinação sinérgica pode prover benefícios terapêuticos significativamente elevados.

[0011] Desta maneira, a invenção provê uma composição compreendendo

[0012] (a) um composto de Fórmula (I):



[0013] (b) o composto de PAC-1:

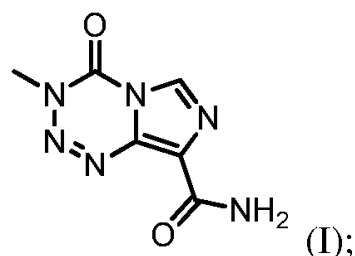


[0014] e (c) um diluente, excipiente, ou veículo farmacologicamente aceitáveis. O composto de Fórmula (I) pode ser temozolomida (TMZ). Em outras modalidades, a estrutura do composto de Fórmula (I) pode ser substituída com um derivado de TMZ, ou um pró-fármaco do mesmo. O veículo pode incluir água e componentes opcionais para vantajosamente distribuir os ativos tais como um tampão, um açúcar, uma ciclodextrina, ou várias combinações dos mesmos. Em uma modalidade, a ciclodextrina é 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

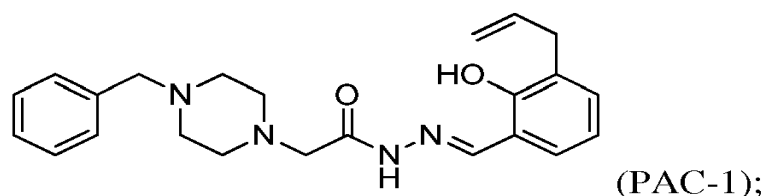
[0015] A concentração do composto de Fórmula I pode ser cerca de 100 μM a cerca de 1 mM, tipicamente cerca de 250 μM , cerca de 500 μM , ou cerca de 750 μM . A concentração de PAC-1 pode ser cerca de 2 μM a cerca de 50 μM , tipicamente cerca de 2,5 μM , cerca de 5 μM , cerca de 7,5 μM , cerca de 10 μM , cerca de 12,5 μM , cerca de 15 μM , cerca de 20 μM , cerca de 25 μM , cerca de 30 μM , cerca de 40 μM , ou cerca de 50 μM . Por exemplo, em uma modalidade a concentração do composto de Fórmula I pode ser cerca de 250 μM a cerca de 750 μM e a concentração de PAC-1 pode ser cerca de 5 μM a cerca de 30 μM .

[0016] A invenção também provê um método de inibir o crescimento ou a proliferação de células de câncer. O método inclui contatar células de câncer com uma quantidade eficaz de uma composição como descrito aqui, em que a composição pode incluir um ou ambos, o PAC-1 e TMZ. Quando a composição inclui somente um PAC-1 e TMZ, o método inclui, subsequentemente, contatar as células de câncer com o outro. Contatar as células de câncer com esses ativos (PAC-1 e TMZ) inibe o crescimento ou proliferação das células de câncer.

[0017] A invenção ainda provê um método de induzir apoptose em uma célula de câncer, compreendendo contatar a célula de câncer com uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I):

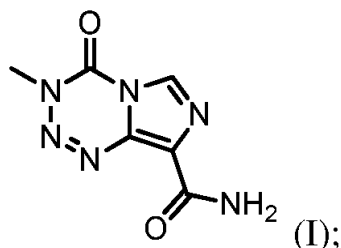


[0018] e uma quantidade eficaz do composto de PAC-1

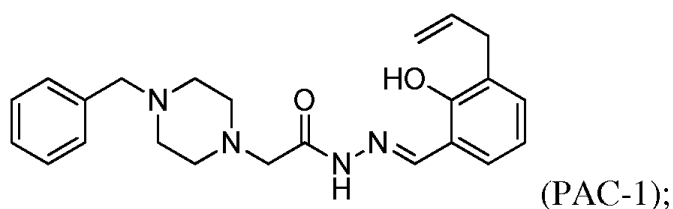


[0019] em que a apoptose é desse modo induzida na célula de câncer. O contato pode ser *in vitro*. Alternativamente, o contato pode ser *in vivo*. Em uma modalidade, a célula de câncer pode ser contatada com o composto de Fórmula (I) e PAC-1 concorrentemente. Em outra modalidade, a célula de câncer pode ser contatada com o composto de Fórmula (I) antes de contatar a célula de câncer com PAC-1. Em ainda outra modalidade, a célula de câncer pode ser contatada com PAC-1 antes de contatar a célula de câncer com o composto e Fórmula (I).

[0020] A invenção também provê um método de tratar um câncer em um paciente com necessidade do mesmo. O método inclui administrar para o paciente, concorrentemente ou sequencialmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Fórmula (I):



[0021] e uma quantidade eficaz do composto de PAC-1:



[0022] em que o câncer é desta maneira tratado. Em uma modalidade, o composto de Fórmula (I) e o composto de PAC-1 podem ser administrados concorrentemente. Em outra modalidade, o composto de Fórmula (I) e o composto de PAC-1 são administrados sequencialmente. Quando administrado sequencialmente, o composto de Fórmula (I) pode ser administrado antes do composto de PAC-1, ou o composto de Fórmula (I) pode ser administrado depois do composto de PAC-1.

[0023] As células de câncer de várias modalidades podem ser célu-

las de câncer no tecido do cérebro, ou células de câncer no tecido dos ossos. Por exemplo, as células de câncer podem ser células de glioblastoma ou células de oligodendroglioma. Em uma outra modalidade, as células de câncer podem ser células de osteossarcoma. Outros tipos de células de câncer que podem ser inibidas e condições cancerosas que podem ser tratadas são adicionalmente descritos abaixo.

[0024] A invenção desse modo provê o uso das composições descritas aqui, para uso em terapia médica. A terapia médica pode ser tratar câncer, por exemplo, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer de cólon e outros cânceres mencionados aqui. A invenção também provê o uso de uma composição, como descrita aqui, para a preparação de um medicamento para tratar uma doença em um mamífero, por exemplo, câncer em um ser humano. A invenção desse modo provê o uso dos compostos descritos aqui para a preparação de medicamentos úteis para o tratamento de câncer em um mamífero, tal como um ser humano. O medicamento pode incluir um diluente, excipiente, ou veículo farmacologicamente aceitáveis.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0025] Os desenhos a seguir fazem parte do relatório descritivo e são incluídos para ainda demonstrar certas modalidades ou vários aspectos da invenção. Em algumas instâncias, as modalidades da invenção podem ser melhor compreendidas por referência aos desenhos que acompanham, em combinação com a descrição detalhada apresentada aqui. A descrição e os desenhos que acompanham podem esclarecer um certo exemplo específico, ou um certo aspecto da invenção. Entretanto, a pessoa versada na técnica compreenderá que porções do exemplo, ou aspectos, podem ser usados em combinação com outros exemplos ou aspectos da invenção.

[0026] **Figura 1.** PAC-1 tem sinergia com TMZ para prolongar a

sobrevivência em um modelo de glioblastoma de rato: Gráfico de sobrevivência de quatro grupos de modelos de ratos sinérgicos intracranianos de 9L. 9L de células (glioma de rato) foram intracranianamente implantados em ratos. PAC-1 (50 mg/kg em água) foi administrado através de gavagem oral nos dias 0-4, e TMZ (50 mg/kg em água) foi dado através de gavagem oral nos dias 5-9; 8 ratos por grupo. O valor de P- é relativo à TMZ sozinho. Tempos médios de sobrevivência: Controle, 14,5 dias; PAC-1, 13.5 dias; TMZ, 20 dias; Combo, 28 dias. Valor total de p da curva de combo é $p=0.0001$. TMZ sozinho para Combo, $p=0.0007$ (teste de categoria de registro) e $p=0,001$ (teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

[0027] **Figura 2.** PAC-1 tem sinergia com TMZ para induzir a morte de células de glioblastoma na cultura. **A)** 9L de células de glioblastoma foram expostas às concentrações indicadas de PAC-1 + TMZ, e a morte da célula foi avaliada em 48 horas (nenhuma morte da célula foi detectada em 0 μM TMZ com 0 μM PAC-1). **B)** D-54 células de glioblastoma de ser humano foram expostas às concentrações indicadas de PAC-1 + TMZ, e a morte da célula foi avaliada em 24 horas (nenhuma morte de célula detectável a 0 μM TMZ com 0 μM PAC-1). Linhas pontilhadas horizontais indicam níveis de morte das células esperado de um mero efeito aditivo dos compostos. As legendas correspondem às barras do gráfico de barras em que a entrada da legenda de topo corresponde à barra mais para a esquerda, e as entradas das legendas remanescentes correspondem às barras remanescentes, do topo até o fundo correspondendo da esquerda para a direita, respectivamente.

[0028] **Figura 3.** PAC-1 tem sinergia com TMZ para induzir a morte de células de osteossarcoma em cultura. **A)** Células HOS foram expostas às concentrações indicadas de PAC-1 + TMZ e a morte da célula foi avaliada em 24 horas (nenhuma morte de célula foi detectada em 0 μM de TMZ com 0 μM de PAC-1). **B)** Células 143B foram expostas às con-

centrações indicadas de PAC-1 + TMZ e a morte da célula foi avaliada em 24 horas (não foi detectada morte de célula em 0 μ M TMZ ou 250 μ M TMZ com 0 μ M de PAC-1). As legendas correspondem às barras do gráfico de barras em que a entrada da legenda de topo corresponde à barra mais para a esquerda, e as entradas de legendas remanescentes correspondem às barras remanescentes, do topo para o fundo correspondendo da esquerda para a direita, respectivamente.

[0029] **Figura 4.** PAC-1 tem sinergia com TMZ para prolongar a sobrevivência em um modelo de camundongo de osteossarcoma metastático. Sete dias depois da injeção de células K7M2, os camundongos foram tratados oralmente com PAC-1 (100 mg/kg em HP β 3CD), TMZ (50 mg/kg oral doce), ou um tratamento seqüencial com cada um, diariamente, por cinco dias consecutivos; n = 8 camundongo por grupo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0030] Como uma introdução adicional, compostos capazes de ativar uma enzima, que é muitas vezes superexpressa, ou de outra maneira presente em níveis aumentados, em sua forma inativa em células de câncer foram verificadas. Os compostos podem induzir morte celular programada (apoptose) em células de câncer, incluindo aquelas que têm níveis sobrerregulados ou aumentados, de procaspase-3. Muitos cânceres resistem à quimioterapia padrão. A terapia de combinação descrita aqui tira vantagem da ativação de procaspase-1 pelo PAC-1, que tem sinergia com as propriedades de alquilação de DNA de TMZ, para prover eficácia sob condições em que um dos ativos sozinho seria menos eficaz ou completamente ineficaz. Esses compostos podem também ser bem sucedidos em terapia de câncer alvejado, em que pode ser vantagem a seletividade de matar as células de câncer com reações adversas, comparavelmente reduzidas para células não cancerosas tendo níveis mais baixos de procaspase-3. Essas reações adversas podem incluir toxicidade, particularmente neurotoxicidade.

[0031] A combinação de compostos, composições e métodos descrita aqui, pode atuar através de modulação de apoptose ou morte celular programada e alquilação de DNA, para ser eficaz no tratamento de células de câncer. Em uma modalidade, a modulação de apoptose é por indução ou ativação de apoptose. Em várias modalidades, a administração de compostos pode ser concorrente, ou alternativamente, sequencial.

[0032] A invenção, desse modo, provê métodos para potencialização de temozolomida (TMZ) por PAC-1, por exemplo, para o tratamento de glioblastoma ou osteossarcoma. Durante a apoptose, a procaspase-3 zimogênea é ativada através de proteólise para caspase-3, e isso ativa caspase-3 depois divide escores de substratos de celular, executando o programa apoptótico. Por causa dos níveis de proteína de procaspase-3 ser elevados em várias histologias de tumor, a ativação direta mediada por fármaco de procaspase-3 pode ser altamente eficaz como uma estratégia seletiva anti-câncer.

[0033] Certos compostos podem intensificar a atividade e automaturação de procaspase-3 e induzir apoptose em células de câncer. O composto-1 (PAC-1) ativando procaspase intensifica a atividade de procaspase-3 através da quelação de íons de zinco inibidores, induz apoptose em células de câncer na cultura, e tem eficácia em múltiplos modelos de tumor de murino. Uma nova combinação de agentes terapêuticos, PAC-1 e TMZ, foi verificada ser sinergisticamente eficaz para tratar células de câncer, particularmente células de glioblastoma e células de osteossarcoma.

[0034] Modelos de experimentos da linha de células de glioblastoma de rato de 9L, provê dados claros para suportar as constatações de sinergia e atividade eficaz da combinação de fármaco. Os experimentos de ratos *in vivo* empregaram células de 9L, um modelo de tumor muito agressivo, implantado inter-cranianamente em ratos nos 3

grupos de tratamento (PAC-1 sozinho, TMZ sozinho, e a combinação de PAC-1 e TMZ) e um grupo de controle.

[0035] O PAC-1 foi suspenso em água, e dado para os ratos através de gavagem oral em 50 mg/kg (uma dose relativamente baixa) por 5 dias seguidos por cinco dias de dosagem de TMZ. Nenhuma neurotoxicidade foi observada com PAC-1 em camundongos, quando o composto foi dado oralmente em até 200 mg/kg, e nenhuma neurotoxicidade foi observada nos experimentos do momento. O benefício de sobrevivência para os ratos, tratados com a combinação, foi significativo e dramático de maneira incomum (**Figura 1**).

[0036] **Figura 1** esquematicamente ilustra os dados obtidos quando 9L de células foram intracranialmente implantadas em ratos. PAC-1 (50 mg/kg em água) foi administrado através de gavagem oral nos dias 0-4, e TMZ (50 mg/kg em H₂O) foi dado através de gavagem oral nos dias 5-9. Oito ratos por grupo; um valor de p- de 0,001 foi obtido, em relação a TMZ sozinho (teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

[0037] A avaliação inicial para o IC₅₀ para PAC-1 com linha de células de 9L é de cerca de 7 µM (experimento de 72 horas). Os tumores de cérebro de linha de células de 9L são tipicamente hemorrágicos, mas nos ratos tratados com PAC-1/TMZ, os tumores não foram hemorrágicos, indicando um efeito antiangiogênico.

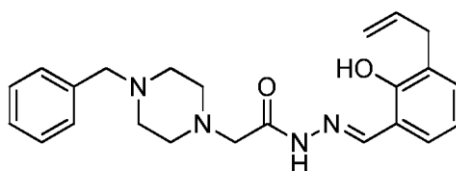
[0038] **Figura 2** mostra três exemplos de PAC-1 sinergizando com TMZ para induzir a morte de células de glioblastoma em cultura. A **Figura 3** mostra dois exemplos de PAC-1 sinergizando com TMZ para induzir a morte de células de osteossarcoma em cultura. A **Figura 4** mostra um exemplo de PAC-1 sinergizando com TMZ para prolongar a sobrevivência em um modelo de camundongo de osteossarcoma metastático.

[0039] Um MTD para a combinação de PAC-1/TMZ está sendo estabelecido, e períodos de tratamento mais longos (10 dias de cada

fármaco concorrentemente) e regime de administração sequencial e concorrente estão sendo avaliados. O benefício de sobrevivência está sendo avaliados como a medição de níveis de procaspase 3 e caspase 3 pré- e pós-tratamento. A terapia de combinação pode também ser eficaz para tratar linhas de células de neuroesfera derivadas de pacientes de glioblastoma de Hopkins, por exemplo, em modelos de xeno-enxertos e indivíduos mamíferos.

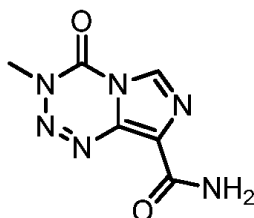
Agentes e Atividade Terapêuticos

[0040] PAC-1 (2-(4-benzilpiperazin-1-il)-N-[(2-hidroxi-3-prop-2-enil)fenil]metilideneamino]acetamida) seletivamente induz apoptose em células cancerosas. Métodos de preparar PAC-1 são descritos na Publicação de Patente U.S. No. 2012/0040995 (Hergenrother et al.).



PAC-1

[0041] Temozolomida (TMZ) é fármaco quimioterápico citotóxico classificado como agente alquilante. TMZ é um derivativo de imidazotetrazina, e é o profármaco de MTIC (3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida). A preparação de TMZ e de seus derivados está descrita na Patente U.S. No. 5.260.291 (Lunt et al.).



Temozolomida (TMZ)

[0042] O benefício terapêutico de temozolomide se origina de sua capacidade para alquilar/metilar o DNA, que pode ocorrer nas posições N-7 ou O-6 de resíduos de guanina. Esta metilação danifica o DNA e deflagra a morte das células do tumor. Algumas células de tu-

mor são capazes de reparar este tipo de dano do DNA e, desta maneira, diminuir a eficácia terapêutica de temozolomida. O mecanismo desta resistência pode ser através da expressão da proteína de metiltransferase de O-6-metilguanina-DNA (MGMT) ou alquiltransferase de O-6-alquilguanina-DNA (AGT ou AGAT). A presença da proteína de metiltransferase de O-6-metilguanina-DNA (MGMT) nos tumores do cérebro prediz uma parca resposta ao temozolomida e esses pacientes recebem pouco benefício da quimioterapia com temozolomida. Desse modo, novas terapias são necessárias para o tratamento de tumores do cérebro e condições relacionadas.

[0043] TMZ tem sido usado para o tratamento de astrocitoma de Grau IV, também conhecido como glioblastoma multiforme, um tumor do cérebro agressivo, como também tumores do cérebro oligodendrogliomas. TMZ tem sido usado para tratar melanoma, e é ainda indicado para astrocitoma anaplástico de Grau II recorrente.

[0044] Embora exista um claro benefício para estratégias anticâncer utilizando combinações de fármacos que atuam sobre diferentes alvos, o trabalho descrito aqui demonstra que drástica sinergia pode ser observada com compostos que atuam através de mecanismos distintos. Esta abordagem de múltiplos alvos pode ter vantagens particulares, quando a ativação de uma enzima é procurada.

[0045] PAC-1 é seguro em mamíferos, e um derivado de PAC-1 foi eficaz na fase I do teste clínico de cães caseiros de estimação com linfoma (Peterson et al., *Câncer Res* 70, 7232-7241 (2010)), desse modo a sinergia observada com TMZ terá significativo impacto clínico. O interesse em ativar enzimas com moléculas pequenas está crescendo rapidamente. Os dados descritos aqui indicam estratégias de alvejar, usando PAC-1 e TMZ, é uma abordagem geral para a intensificação drástica do efeito biológico pretendido e deverá ter considerável impacto clínico devido a sua eficácia.

Métodos da Invenção

[0046] A invenção provê métodos de seletivamente induzir apoptose em uma célula de câncer, compreendendo administrar para uma célula de câncer uma combinação de compostos capaz de modificar uma molécula de procaspase-3 da dita célula de câncer; em que a combinação de compostos é PAC-1 e TMZ. É também provido um método de seletivamente induzir apoptose em uma célula de câncer, compreendendo administrar para uma célula de câncer uma combinação de compostos capaz de modificar uma molécula de procaspase-3 da célula de câncer; em que a combinação de compostos é PAC-1 e TMZ, por exemplo, em que a célula de câncer está em um paciente com necessidade de tratamento.

[0047] A invenção provê métodos adicionais em que a combinação de compostos mencionada é PAC-1 e TMZ, por exemplo, como um método de tratar uma célula de câncer, compreendendo (a) identificar um suscetibilidade potencial ao tratamento de uma célula de câncer com um composto ativador de procaspase; e (b) expor a célula de câncer a uma quantidade eficaz de uma combinação de um composto ativador de procaspase e TMZ. É também provido um método de tratar uma célula de câncer, compreendendo (a) identificar uma suscetibilidade potencial ao tratamento de uma célula de câncer com um composto ativador de procaspase; e (b) expor a dita célula de câncer a uma quantidade eficaz de PAC-1 e TMZ; em que o PAC-1 é capaz de ativar pelo menos um de procaspase-3 e procaspase-7. É também provido um método de induzir a morte em uma célula de câncer (por exemplo, matando uma célula de câncer), compreendendo administrar para uma célula de câncer TMZ e um composto capaz de ativar uma molécula de procaspase-3 da célula de câncer.

[0048] A invenção ainda provê um medicamento compreendendo uma quantidade eficaz da combinação de PAC-1 e TMZ. O medica-

mento pode ser usado em um método de induzir apoptose em uma célula. Em algumas modalidades, a combinação de compostos não cruza a barreira de sangue do cérebro até um ponto que cause efeitos de neurotoxicidade apreciável em um paciente. Métodos da invenção incluem contatar uma ou mais células com uma quantidade eficaz de uma combinação de compostos descrita aqui, *in vivo* ou *in vitro*. A invenção desse modo também provê métodos de tratar uma célula, que incluem contatar uma célula com uma quantidade eficaz de uma combinação de compostos descrita aqui.

Definições

[0049] Como usado aqui, os termos citados têm os significados a seguir. Todos os outros termos e frases usados neste relatório descritivo têm seus significados comuns como a pessoa versada na técnica compreenderá. Tais significados comuns podem ser obtidos por referência aos dicionários técnicos, tais como *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* 14th Edição, por R.J. Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001.

[0050] Referências no relatório descritivo a "uma modalidade", "na modalidade", etc., indicam que a modalidade descrita pode incluir um particular aspecto, traço, estrutura, porção, ou característica, mas não toda modalidade necessariamente inclui esse aspecto, traço, estrutura, porção, ou característica. Além do mais, tais frases podem, mas não necessariamente, se referir à mesma modalidade referida em outras partes do relatório descritivo. Ainda, quando um particular aspecto, traço, estrutura, porção, ou característica é descrita, em conexão com uma modalidade, está dentro do conhecimento da pessoa versada na técnica, afetar ou conectar tal aspecto, traço, estrutura, porção, ou característica com outras modalidades, estejam ou não explicitamente descritas.

[0051] As formas no singular "um," "uma," e "o/a" incluem referência no plural, a menos que o contexto claramente indique de outra ma-

neira. Desse modo, por exemplo, uma referência a "um composto" inclui uma pluralidade de tais compostos, de maneira que um composto X inclui uma pluralidade de compostos X. É ainda observado que as reivindicações podem ser esboçadas para excluir qualquer elemento opcional. Como tal, esta determinação é destinada a servir como base antecedente para o uso de terminologia exclusiva, tal como "unicamente," "somente," e similares, em conexão com a menção de elementos de reivindicação ou uso de uma limitação "negativa".

[0052] O termo "e/ou" significa qualquer um dos itens, qualquer combinação dos itens, ou todos os itens com os quais este termo está associado. A frase "um ou mais" é prontamente compreendida pela pessoa versada na técnica, particularmente quando lida no contexto do seu uso. Por exemplo, um ou mais substituintes em um anel de fenila se refere a um até cinco, ou um até quatro, por exemplo, se o anel de fenila é dissubstituído.

[0053] O termo "cerca de" pode se referir a uma variação de + 5%, + 10%, + 20%, ou + 25% do valor especificado. Por exemplo, "cerca de 50" por cento pode, em algumas modalidades, carregar uma variação de 45 a 55 por cento. Para faixas inteiras, o termo "cerca de" pode incluir um ou dois números inteiros maiores do que e/ou menores do que um número inteiro mencionado em cada fim da faixa. A menos que indicado de outra maneira aqui, o termo "cerca de" é destinado a incluir valores, por exemplo, por cento em peso, próximo à faixa mencionada que são equivalentes em termos de funcionalidade do ingrediente individual, a composição, ou a modalidade.

[0054] Como será compreendido pelo técnico versado, todos os números, incluindo aqueles expressando quantidades de ingredientes, propriedades tais como peso molecular, condições de reação, e assim por diante, são aproximações e são compreendidas como sendo opcionalmente modificadas em todas as instâncias pelo termo "cerca de."

Esses valores podem variar dependendo das propriedades desejadas buscadas para ser obtidas por aqueles versados na técnica, utilizando os ensinamentos das descrições aqui. É também compreendido que tais valores inerentemente contêm variabilidade, necessariamente resultando de desvios padrão encontrados em suas respectivas medições de teste.

[0055] Como será compreendido por aquele versado na técnica, para qualquer e todos os propósitos, particularmente em termos de prover uma descrição escrita, todas as faixas mencionadas aqui também abrangem qualquer e todas as possíveis subfaixas e combinações de subfaixas dos mesmos, como também os valores individuais formando a faixa, particularmente valores de números inteiros. Uma faixa mencionada (por exemplo, percentagens em peso ou grupos de carbono) inclui cada valor específico, número inteiro, decimal, ou identidade dentro da faixa. Qualquer faixa listada pode ser facilmente reconhecida como suficientemente descrevendo e possibilitando a mesma faixa ser dividida pelo menos metades, terços, quartos, quintos ou décimos. Como um exemplo não limitante, cada faixa discutida aqui pode ser prontamente dividida em um terço mais baixo, terço médio e terço superior, etc. Como será também compreendido pela pessoa versada na técnica, toda linguagem tal como "até", "pelo menos", "maior do que", "menor do que", "mais do que", "ou mais", e similares, inclui o número mencionado e tais termos se referem às faixas ranges que podem ser subsequentemente divididas em sub-faixas como discutido acima. Da mesma maneira, todas as proporções mencionadas aqui também incluem todas as subproporções que se enquadram na proporção mais ampla. Desta maneira, valores específicos mencionados para radicais, substituintes, e faixas, são para ilustração somente; eles não excluem outros valores definidos ou outros valores dentro de faixas definidas para radicais e substituintes.

[0056] A pessoa versada na técnica irá também prontamente reconhecer que quando os membros estão agrupados juntos de uma maneira comum, tal como em um grupo Markush, a invenção abrange não somente o grupo inteiro listado como um todo, mas cada membro do grupo individualmente e dos os subgrupos possíveis do grupo principal. Adicionalmente, para todos os fins, a invenção abrange não só o grupo principal, mas também um ou mais membros do grupo que estão ausentes do grupo principal. A invenção desta maneira prevê a exclusão explícita de qualquer um ou mais dos membros de um grupo mencionado. Por conseguinte, as cláusulas podem se aplicar a qualquer uma das categorias ou modalidades descritas, dessa maneira qualquer um ou mais dos elementos, espécies, ou modalidades mencionadas, podem ser excluídas de tais categorias ou modalidades, por exemplo, como usado em uma limitação negativa explícita.

[0057] O termo "contatar" se refere ao ato de tocar, fazer contato, ou de trazer para proximidade imediata ou perto, incluindo o nível celular ou molecular, por exemplo, para trazer cerca de uma reação fisiológica, uma reação química, ou uma mudança física, por exemplo, em uma solução, em uma mistura de reação, *in vitro*, ou *in vivo*.

[0058] "Concorrentemente" significa (1) simultaneamente no tempo, ou (2) em tempos diferentes durante o curso de um programa de tratamento comum.

[0059] "Sequencialmente" se refere à administração de um agente ativo usado no método seguido pela administração de um outro agente ativo. Depois da administração de um agente ativo, o próximo agente ativo pode ser administrado substancialmente imediatamente depois do primeiro, ou o próximo agente ativo pode ser administrado depois de um período de tempo efetivo, depois do primeiro agente ativo; o período de tempo efetivo é a quantidade de tempo dado para a realização do benefício máximo para a administração do primeiro agente ativo.

[0060] Uma "quantidade eficaz" se refere a uma quantidade eficaz para tratar uma doença, distúrbio, e/ou condição, ou para produzir um efeito mencionado, tal como ativação ou inibição. Por exemplo, uma quantidade eficaz pode ser uma quantidade eficaz para reduzir a progressão ou gravidade da condição ou dos sintomas sendo tratados. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está bem dentro da capacidade das pessoas versadas na técnica. O termo "quantidade eficaz" é destinado a incluir uma quantidade de um composto descrito aqui, ou uma quantidade de uma combinação de compostos descrita aqui, por exemplo, que é eficaz para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio, ou para tratar os sintomas da doença o distúrbio, em um hospedeiro. Desse modo, uma "quantidade eficaz" geralmente significa uma quantidade que provê o efeito desejado. Em uma modalidade, uma quantidade eficaz se refere a uma quantidade do agente ativo descrita aqui que são eficazes, sós ou em combinação com veículo farmacêutico, mediante administração de dose única ou múltiplas doses para uma célula ou um sujeito, por exemplo, um paciente, em inibir o crescimento ou a proliferação, induzindo matar, ou prevenindo o crescimento de células hiperproliferativas. Tal inibição de crescimento ou morte pode ser refletida como um prolongamento da sobrevivência do sujeito, por exemplo, um de um paciente, além daquela esperada na ausência de tal tratamento, ou qualquer melhoria no prognóstico do sujeito em relação à ausência de tal tratamento.

[0061] Os termos "tratando", "tratar" e "tratamento" incluem (i) prevenir uma doença, condição patológica ou médica de ocorrer (por exemplo, profilaxia); (ii) inibir a doença, condição patológica ou médica ou impedir seu desenvolvimento; (iii) aliviando a doença, condição patológica ou médica; e/ou (iv) diminuindo sintomas associados com a doença, condição patológica ou médica. Desse modo, os termos "tratar", "tratamento", e "tratando" pode se estender à profilaxia e pode

incluir prevenir, prevenção, prevendo, diminuir, interromper ou reverter a progressão ou gravidade da condição ou sintomas sendo tratados. Como tal, o termo "tratamento" pode incluir administração médica, terapêutica, e/ou profilática, como apropriado. Em algumas modalidades, os termos "tratamento", "tratar" ou "tratado" podem ser referir à (i) prevenção do crescimento do tumor ou recrescimento do tumor (profilaxia), (ii) uma redução ou eliminação de sintomas ou doença de interesse (terapia) ou (iii) a eliminação ou destruição do tumor (cura).

[0062] Os termos "inibir", "inibindo", "inibição" se referem a diminuir, deter, ou reverter o crescimento ou progressão de uma doença, infecção, condição, ou grupo de células. A inibição pode ser maior do que cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, ou 99%, por exemplo, em comparação ao crescimento ou progressão que ocorre na ausência do tratamento ou contato. Adicionalmente, os termos "induz," "inibe," "potencializa," "eleva," "aumenta," "diminui," ou similares denotam diferenças quantitativas entre dois estados, e podem se referir a, pelo menos, estatisticamente significativas diferenças entre os dois estados. Por exemplo, "uma quantidade eficaz para inibir o crescimento de células hiperproliferadoras" significa que a taxa de crescimento das células pode ser, em algumas modalidades, pelo menos estatisticamente, significativamente diferente das células não tratadas. Tais termos podem ser aplicados aqui para, por exemplo, taxas de proliferação.

[0063] A frase "inibindo o crescimento ou proliferação" da célula hiperproliferadora, por exemplo, células neoplásticas, se refere a retardar, interromper, suspender, ou interromper seu crescimento e metástase, e não necessariamente indica uma eliminação total do crescimento neoplástico.

[0064] O termo "câncer" geralmente se refere a qualquer uma do grupo de mais de 100 doenças causadas pelo crescimento descontrolado de células anormais. O câncer pode tomar a forma de tumores sólidos

e linfomas, e cânceres não sólidos como leucemia. Ao contrário das células normais, que se reproduzem até a maturação e depois somente quando necessário para substituir células feridas, as células de câncer podem crescer e se dividir perpetuamente, se afastando ou por perto das células e finalmente se espalhando para outras partes do corpo.

[0065] A invenção provê métodos para tratar câncer e condições cancerosas. O termo "condição cancerosa" se refere a qualquer condição em que as células estão em um estado ou condição anormal, que é caracterizada pela proliferação rápida ou neoplasia. Uma condição cancerosa pode ser maligna ou não maligna (por exemplo, condição pré-cancerosa) por natureza. Para mais Para adicionalmente descrever uma "condição cancerosa", os termos "hiperproliferativa", "hiperplástica", "hiperplasia", "maligna", "neoplástica" e "neoplasia" podem ser usados. Esses termos podem ser usados trocavelmente e são destinados a incluir todos os tipos de crescimento hiperproliferativo, crescimento hiperplástico, crescimento canceroso ou processos oncogênicos, tecidos metastáticos ou células, tecidos ou órgãos malignamente transformados, independente do tipo histopatológico, estágio invasivo, ou determinação cancerosa (por exemplo, maligno e não maligno).

[0066] O termo "neoplasia" se refere ao novo crescimento de célula que resulta em uma perda de receptividade aos controles de crescimento normal, por exemplo, crescimento de célula neoplástica. Uma "hiperplasia" se refere às células sofrendo uma taxa de crescimento anormalmente alta. Entretanto, estes termos podem ser usados trocavelmente, como seu contexto revelará, referindo-se geralmente às células experimentando taxas de crescimento anormais. "Neoplasias" e "hiperplasias" incluem tumores, que podem ser benignos, pré-malignos, carcinoma in-situ, maligno, sólido ou não sólido.

[0067] Foi verificado que a combinação de PAC-1 e TMZ é particularmente eficaz para tratar cânceres do cérebro. Cânceres do cérebro

incluem, mas não são limitados a, oligodendrogliomas e glioblastomas incluindo glioblastoma multiforme (GBM). Tecidos afetados pelas células cancerosas podem estar no próprio cérebro (por exemplo, no crânio ou no canal espinal central) ou no tecido linfático, nos vasos sanguíneos, nos nervos cranianos, nos envoltórios do cérebro (meninges), crânio, glândula pituitária, ou glândula pineal. Formas específicas de câncer do cérebro que podem ser tratadas incluem astrocitomas, condromas, condrossarcomas, cordomas, CNS (sistema nervoso central) linfomas, craniofaringeomas, ependimomas, gangliogliomas, ganglioneuromas (também chamados gangliocitomas), gliomas, incluindo astrocitomas, oligodendrogliomas, e ependimomas, hemangioblastomas (também chamados tumores vasculares), tumores neuroectodermis primitivos (PNET) tais como meduloblastomas, meningiomas, e vestibular schwannomas (anteriormente conhecidos como neuroma acústico / schwannoma).

[0068] A combinação pode também ser usada para tratar tumores metastáticos que invadem a esfera intracraniana de cânceres originários de outros órgãos do corpo. Essas condições são tipicamente referidas como tumores do cérebro secundários. Tumores do cérebro secundários, que podem ser tratados com a combinação de PAC-1 e TMZ, incluem tumores metastáticos do cérebro que se originam de câncer do pulmão, câncer de mama, melanoma maligno, câncer do fígado, câncer do cólon, e outros carcinomas.

[0069] Outros exemplos de condições cancerosas que estão dentro do escopo da invenção incluem, mas não são limitados a, neuroblastomas e carcinomas osteogênicos (por exemplo, câncer de osso ou crescimento neoplástico de tecido no osso). Exemplos de tumores de osso primário maligno que podem ser tratados com a combinação de PAC-1 e TMZ, incluem osteossarcomas, condrossarcomas, sarcoma de Ewing, fibrossarcomas, e similares, e tumores de osso secun-

dários, tais como lesões metastáticas que se espalharam se outros órgãos, incluindo carcinomas de mama, pulmão, e próstata.

Formulações Farmacêuticas

[0070] Os compostos descritos aqui podem ser usados para preparar composições farmacêuticas terapêuticas, por exemplo, combinando os compostos com um diluente, excipiente, ou veículo farmacêuticamente aceitáveis. Os compostos podem ser adicionados a um veículo na forma de um sal ou solvato. Por exemplo, nos casos em que compostos são suficientemente básicos ou ácidos para formar sais de ácido ou base não tóxicos estáveis, administração dos compostos como sais podem ser apropriados. Exemplos de sais farmacêuticamente aceitáveis são sais de adição de ácido orgânico formados com ácidos que formam um ânion fisiológico aceitável, por exemplo, tosilato, metanossulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetogluturato, e β -glicerofosfato. Sais inorgânicos apropriados podem também ser formados, incluindo sais de cloridrato, haleto, sulfato, nitrato, bicarbonato, e carbonato.

[0071] Sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser obtidos usando procedimentos-padrão conhecidos na técnica, por exemplo, reagindo um composto suficientemente básico, tal como uma amina, com um ácido apropriado para prover um composto iônico fisiologicamente aceitável. Metal de álcali (por exemplo, sódio, potássio ou lítio) ou metal alcalinoterroso (por exemplo, cálcio) sais de ácidos carboxílicos podem também ser preparados por métodos análogos.

[0072] Os compostos descritos aqui podem ser formulados como composições farmacêuticas e administrados para um hospedeiro mamífero, tal como um paciente ser humano, em uma variedade de formas. As formas podem ser especificamente adaptadas a uma via de administração escolhida, por exemplo, administração oral ou parenteral, por vias intravenosa, intramuscular, tópica ou subcutânea.

[0073] Os compostos descritos aqui podem ser sistemicamente administrados em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável, tal como um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável. A solubilidade de ativos pode ser aumentada pela de ciclodextrinas, tais como 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Para administração oral, compostos podem ser envolvidos em cápsulas de gelatina de invólucro rígido ou macio, prensados em comprimidos, ou incorporados diretamente no alimento da dieta de um paciente. Compostos podem também ser combinados com um ou mais excipientes e usados na forma de comprimidos de ingestão, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, wafers, e similares. Tais composições e preparações tipicamente contêm pelo menos 0,1% de composto ativo. A percentagem das composições e preparações pode variar e pode convenientemente ser de cerca de 1% a cerca de 60%, ou cerca de 2% a cerca de 25%, do peso de uma dada forma de dosagem unitária. A quantidade de composto ativo em tais composições terapêuticamente úteis é de tal modo que um nível de dosagem eficaz pode ser obtido.

[0074] Os comprimidos, pastilhas, pílulas, cápsulas, e similares podem também conter um ou mais dos seguintes: aglutinantes tais como goma de tragacanto, acácia, amido de milho ou gelatina; excipientes tais como fosfato de dicálcio; um agente desintegrante tal como, amido de batata, ácido algínico e similares; e um lubrificante tal como estearato de magnésio. Um agente adoçante tal como sacarose, frutose, lactose ou aspartame; ou um agente flavorizante tal como hortelã-pimenta, óleo de gualtéria, ou flavorizante de cereja, podem ser adicionados. Quando a forma de dosagem unitária é uma cápsula, ela pode conter, em adição aos materiais do tipo acima, um veículo líquido, tal como um óleo vegetal ou um polietileno glicol. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou para, de outra maneira, modificar a forma física da forma de dosagem unitária sólida. Por

exemplo, comprimidos, pílulas, ou cápsulas podem ser revestidos com gelatina, cera, laca ou açúcar e similares. Um xarope ou elixir pode conter o composto ativo, sacarose ou frutose e um agente adoçante, metil e propil parabenos como conservantes, um corante e flavorizante tal como sabor de cereja e laranja. Qualquer material usado na preparação de qualquer forma de dosagem unitária deverá ser farmacêuticamente aceitável e substancialmente não tóxico nas quantidades empregadas. Além disso, o composto ativo pode ser incorporado nas preparações e dispositivos de liberação prolongada.

[0075] O composto ativo pode ser administrado intravenosamente ou intraperitonealmente por infusão ou injeção. Soluções do composto ativo ou seus sais podem ser preparadas em água, opcionalmente misturadas com um tensoativo não tóxico. Dispersões podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis, triacetina, ou misturas dos mesmos, ou em um óleo farmacêuticamente aceitável. Sob condições comuns de armazenamento e uso, as preparações podem conter um conservante para prevenir o crescimento de microorganismos.

[0076] Formas de dosagem farmacêutica apropriadas para injeção ou infusão podem incluir soluções aquosas estéreis, dispersões, ou pó estéreis compreendendo o ingrediente ativo adaptado para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis ou infusíveis, opcionalmente encapsuladas em lipossomas. A forma de dosagem, em última análise, deve ser estéril, fluida e estável sob as condições de preparação de armazenamento. O transportador ou veículo líquido pode ser um solvente ou meio de dispersão líquido compreendendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, glicóis de polietileno líquido, e similares), óleos vegetais, ésteres de glicerila não tóxicos, e misturas apropriadas dos mesmos. A fluidez própria pode ser mantida, por exemplo, pela formação de lipossomas, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dis-

persões, ou através do uso de tensoativos. A prevenção da ação de microorganismos pode ser conduzida por cerca de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal, e similares. Em muitos casos, se for preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, tampões, ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser causada por agentes que retardam a absorção, por exemplo, de alumínio monoestearato e/ou gelatina.

[0077] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo, na quantidade requerida, no solvente apropriado com vários outros ingredientes enumerados acima, como requerido, opcionalmente seguidos por esterilização de filtro. No caso de pós estéreis, para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação podem incluir técnicas de secagem a vácuo e secagem por congelamento, que rendem um pó de ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional nas soluções estéreis filtrada anteriormente.

[0078] Dosagens úteis dos compostos descritos aqui podem ser determinadas comparando sua atividade *in vitro*, e atividade *in vivo* em modelos animais. Métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em camundongos, e outros animais, para seres humanos são conhecidos na técnica; por exemplo, ver Patente U.S. No. 4.938.949 (Borch et al.). A quantidade de um composto, ou um sal ativo ou derivado dos mesmos, requerido para uso no tratamento, vai variar não só com o composto particular ou sal selecionado, mas também com a via de administração, a natureza da condição sendo tratada, e a idade e condição do paciente, e será, em última análise, a critério de um médico ou clínico atendente.

[0079] A combinação de compostos pode ser convenientemente administrada em uma forma de dosagem unitária, por exemplo, conten-

do 100 a 5.000 mg/m², 300 a 4.000 mg/m², 370 a 3.700 mg/m², 50 a 750 mg/m², ou 750 a 4.000 mg/m² de ingrediente ativo por forma de dosagem unitária. Cada composto, individualmente ou em combinação, pode também ser administrado em cerca de 1 mg/kg a cerca de 250 mg/kg, cerca de 10 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, cerca de 10 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, cerca de 50 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, cerca de 10 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, ou cerca de 10 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 50 mg/kg, cerca de 75 mg/kg, cerca de 100 mg/kg, ou cerca de 150 mg/kg, ou uma faixa a partir de qualquer um dos valores mencionados acima até quaisquer outros dos valores mencionados acima. Os compostos podem também ser administrados para um sujeito para prover uma concentração de plasma no estado firme dos fármacos, sozinhos ou em combinação, de cerca de 1 µmol/L a cerca de 25 µmol/L, ou cerca de 10 µmol/L, ou cerca de 15 µmol/L.

[0080] Em algumas modalidades, a invenção provê os compostos em concentrações eficazes a cerca de 10 µM até cerca de 100 µM. Em outra modalidade, as concentrações eficazes são de cerca de 200 nM a cerca de 50 µM, cerca de 500 nM a cerca de 40 µM, cerca de 750 nM a cerca de 25 µM, cerca de 1 µM a cerca de 20 µM, ou cerca de 1 µM a cerca de 10 µM. Em outra modalidade, a concentração eficaz é considerada ser um valor tal como 50% de concentração da atividade em um ensaio de ativação direta de procaspase, em um ensaio de indução de apoptose de célula, ou em uma avaliação terapêutica clínica de animal. Em uma modalidade, tal valor é menos do que cerca de 200 µM. Em outra modalidade, o valor é menos do que cerca de 10 µM, porém maior do que cerca de 10 nM. A dose desejada pode convenientemente ser apresentada em uma dose única ou como doses divididas administradas em intervalos apropriados, por exemplo, como duas, três, quatro ou mais subdoses por dia. A própria subdose pode ser ainda dividida, por exemplo, em um número de administrações es-

paçadas soltas discretas.

[0081] Os compostos descritos aqui podem ser agentes antitumor eficazes e ter potência maior e/ou toxicidade reduzida quando comparados à administração de qualquer agente único. A invenção provê métodos terapêuticos de tratar câncer em um mamífero, que envolvem administrar para um mamífero tendo câncer uma quantidade eficaz de um composto ou composição descrita aqui. Um mamífero inclui um primata, ser humano, roedor, canino, felino, bovino, ovino, equino, suíno, caprino, bovino, e similares. Câncer se refere a vários tipos de neoplasma maligno, por exemplo, câncer do cólon, câncer de mama, melanoma e leucemia, entre outros descritos aqui, e em geral é caracterizado por uma proliferação celular indesejável, por exemplo, crescimento desregulado, falta de diferenciação, invasão do tecido local, e metástase.

[0082] A capacidade de um composto da invenção para tratar câncer pode ser determinada usando ensaios bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o projeto de protocolos de tratamento, avaliação de toxicidade, análise de dados, quantificação de morte de célula de tumor, e o significado biológico do uso de telas de tumores transplantáveis são conhecidos. Além disso, a capacidade de um composto para tratar câncer pode ser determinada usando os ensaios descritos acima nas citações e documentos de patente citados aqui.

[0083] A invenção também provê formas de pró-fármacos de compostos. Qualquer composto que será convertido *in vivo* para prover PAC-1 ou TMZ é um profármaco. Numerosos métodos de formar pró-fármacos são bem conhecidos na técnica. Exemplos de pró-fármacos e métodos de prepará-los são encontrados, inter alia, em Design of Prodrugs, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985), Methods in Enzymology, Vol. 42, na pp. 309-396, editado por K. Widder, et. al. (Academic Press, 1985);

[0084] Um Livro Texto de Projeto e Desenvolvimento de Fármaco,

editado por Krosgaard-Larsen e H. Bundgaard, Capítulo 5, "Design and Application of Prodrugs," por H. Bundgaard, at pp. 113191, 1991); H. Bundgaard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 8, p. 1-38 (1992); H. Bundgaard, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 77, p. 285 (1988); e Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, páginas 388-392).

[0085] Adicionalmente, em algumas modalidades, PAC-1 pode ser trocado por um derivado de PAC-1 ou outro inibidor, tal como um composto descrito na Patente U.S. No. 7.632.972 (Hergenrother et al.), Publicação de Patente U.S. Nos. 2012/0040995 (Hergenrother et al.) e 2007/0049602 (Hergenrother et al.), e Pedido U.S. Série No. 12/597,287 (Hergenrother et al.). Compostos, métodos, e técnicas úteis para terapia do câncer que podem ser usados em combinação com a descrição aqui, são descritos nos documentos mencionados acima, como também nas Patentes U.S. Nos. 6.303.329 (Heinrikson et al.), 6.403.765 (Alnemri), 6.878.743 (Choong et al.), e 7.041.784 (Wang et al.), e Publicação de Patente U.S. No. 2004/0180828 (Shi). Métodos pra realizar os testes e avaliar linhas de células de câncer podem ser realizados como descrito por Putt et al., *Nature Chemical Biology* **2006**, 2(10), 543-550; Peterson et al., *J. Mol. Biol.* **2009**, 388, 144-158; e Peterson et al., *Cancer Res.* **2010**, 70(18), 7232-7241.

[0086] O Exemplo a seguir é destinado a ilustrar a invenção acima e não deverá ser considerado como limitando seu escopo. A pessoa versada na técnica prontamente reconhecerá que os Exemplos sugerem muitas outras maneiras em que a invenção poderá ser praticada. Deverá ser compreendido que numerosas variações e modificações podem ser feitas, enquanto permanecendo dentro do escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Eficácia *In vivo* de PAC-1 em Combinação com Te-

mozolomida (TMZ) em 9L de Glioma de Rato

[0087] 9L de gliossarcoma foram mantidos como uma massa subcutânea sólida nos flancos de ratos F344. Para implante intracraniano, os 9L de tumor de gliossarcoma foram cirurgicamente excisados do animal veículo e fatiados em peças de 1 mm³ na hora do implante. Essas peças de tumor de 1 mm³ foram intracranialmente implantadas em 32 ratos F344 como descrito anteriormente (Joshi et al., *Avaliação de combinações do inibidor de tirosina cinase para terapia de glioblastoma*. PLoS One (2012) 7: e44372; Gallia et al., *Inibição de Akt inibe o crescimento de células de glioblastoma e do tipo tronco de glioblastoma*. Mol. Câncer Ther. (2009) 8: 386-393).

[0088] Os animais foram divididos nos quatro grupos experimentais a seguir com oito animais por grupo: (1) Controle, (2) PAC-1 sozinho, (3) TMZ sozinho, e (4) PAC -1 + TMZ. Os animais de controle receberam só água. Dois grupos de animais de PAC -1 sozinho e PAC -1 + TMZ receberam uma gavagem oral de PAC -1 suspenso em água a partir do dia 0 seis horas depois do implante. O PAC -1 foi administrado somente por 5 dias a partir do dia 0 ao dia 4. Os animais de TMZ sozinho e grupos de PAC -1 + TMZ receberam 5 doses de TMZ em água administrado oralmente a partir do dia 5 ao dia 9. Os animais experimentais não receberam nenhum tratamento depois disso e foram avaliados por sobrevivência total. A combinação de PAC -1 + TMZ que tratou animais teve um aumento de sobrevivência significativamente maior (sobrevivência média = 28 dias) em comparação aos animais tratados com TMZ sozinho (sobrevivência média = 20 dias) ou animais de controle não tratados (sobrevivência média = 20 dias) (**Figura 1**).

Exemplo 2. Formas de Dosagem farmacêuticas

[0089] As formulações a seguir ilustram formas de dosagens farmacêuticas representativas que podem ser usadas para administração terapêutica ou profilática dos compostos das combinações descritas

aqui (por exemplo, PAC-1 e TMZ), ou sais farmacêuticamente aceitáveis ou solvatos dos mesmos (daqui em diante referidos como 'Compostos X'):

<u>(i) Comprimido 1</u>	<u>mg/tabela</u>
'Compostos X'	200,0
Lactose	77,5
Povidona	15,0
Croscarmelose de sódio	12,0
Celulose microcristalina	92,5
Estearato de magnésio	<u>3,0</u>
	400,0
<u>(ii) Comprimido 2</u>	<u>mg/tabela</u>
'Compostos X'	120,0
Celulose microcristalina	410,0
Amido	50,0
Glicolato de amido de sódio	15,0
Estearato de magnésio	<u>5,0</u>
	600,0
<u>(iii) Cápsula</u>	<u>mg/cápsula</u>
'Compostos X'	110,0
Dióxido de silício coloidal	1,5
Lactose	465,5
Amido pré-gelatinizado	120,0
Estearato de magnésio	<u>3,0</u>
	700,0
<u>(iv) Injeção 1 (1 mg/mL)</u>	<u>mg/cápsula</u>
'Compostos X'	1.0
Fosfato de sódio dibásico	12.0
Fosfato de sódio monobásico	0.7
Cloreto de sódio	4.5
Solução de hidróxido de sódio de 1.0 N (ajuste de pH para 7.0-7.5)	q.s
Água para injeção	q.s. ad 1 mL
<u>(v) Injeção 2 (10 mg/mL)</u>	<u>mg/cápsula</u>
'Compostos X'	10.0
Fosfato de sódio monobásico	0.3
Fosfato de sódio dibásico	1.1
Polietileno glicol 400	200.0
Solução de hidróxido de sódio de 0.1 N (ajuste de pH para 7.0-7.5)	q.s
Água para injeção	q.s. ad 1 mL
<u>(vi) Aerosol</u>	<u>mg/can</u>
'Compostos X'	20
Ácido oleico	10
Tricloromonofluorometano	5,000
Diclorodifluorometano	10,000
Diclorotetrafluoroetano	5,000

[0090] Estas formulações podem ser preparadas pelos procedimentos convencionais bem conhecidos na técnica farmacêutica. Será

percebido que as composições farmacêuticas acima podem ser variadas de acordo com técnicas farmacêuticas bem conhecidas para acomodar quantidades e tipos diferentes do ingrediente ativo 'Composto X'. A formulação de aerossol (vi) pode ser usada em conjunto com um distribuidor de dose de aerossol padrão, medida. Adicionalmente, os ingredientes e as proporções específicos são para fins ilustrativos. Os ingredientes podem ser trocados por equivalentes apropriados e as proporções podem ser variadas, de acordo com as propriedades desejadas da forma de dosagem de interesse.

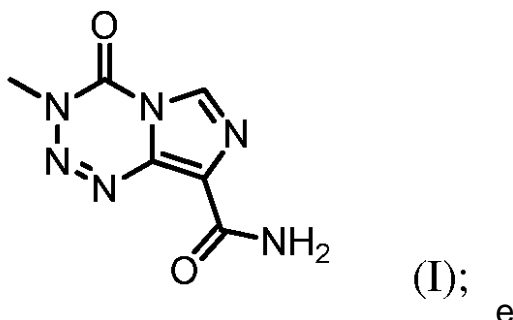
[0091] Embora modalidades específicas tenham sido descritas acima, com referência às modalidades e exemplos descritos, tais modalidades são somente ilustrativas e não limitam o escopo da invenção. Mudanças e modificações podem ser feitas de acordo com a habilidade comum na técnica, sem se afastar da invenção em seus aspectos mais amplos, como definidos nas reivindicações a seguir.

[0092] Todas as publicações, patentes, e documentos de patente estão incorporados aqui por referência como também individualmente incorporadas por referência. Nenhuma limitação inconsistente com esta descrição deve ser compreendida a partir da mesma. A invenção foi descrita com referência às várias modalidades e técnicas específicas e preferidas. Entretanto, deverá ser entendido que muitas variações e modificações podem ser feitas, enquanto permanecendo dentro do espírito e escopo da invenção.

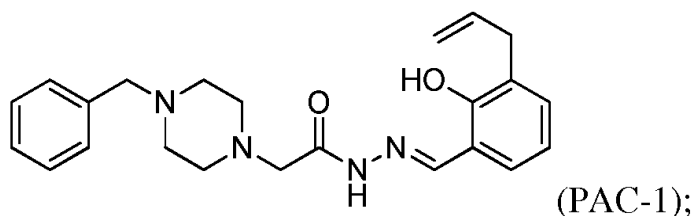
REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma combinação compreendendo:

(a) um composto de Fórmula (I):



(b) um composto PAC-1



caracterizado pelo fato de que é para preparar um medicamento para o tratamento de câncer em um paciente em necessidade do mesmo.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o medicamento compreende uma composição de ambos os compostos de Fórmula (I) e o composto PAC-1.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o medicamento compreende composições individuais do composto de Fórmula (I) e do composto PAC-1.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o composto de Fórmula (I) é preparado para um medicamento que é usado antes do composto PAC-1.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o composto de Fórmula (I) é preparado para um medicamento que é usado após o composto PAC-1.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração do composto de Fórmula (I) é de 250 μM a

750 μM .

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a concentração do composto de Fórmula (I) é 250 μM , 500 μM ou 750 μM .

8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de PAC-1 é de 5 μM a 30 μM .

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a concentração de PAC-1 é 5 μM , 10 μM , 12,5 μM ou 25 μM .

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o composto de Fórmula (I) é preparado para um medicamento oral.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o composto PAC-1 é preparado para um medicamento oral.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o câncer é glioblastoma, oligodendroglioma, ou osteossarcoma.

PAC-1 sinergiza com TMZ para prolongar a sobrevivência em uma modelo de rato de glioblastoma

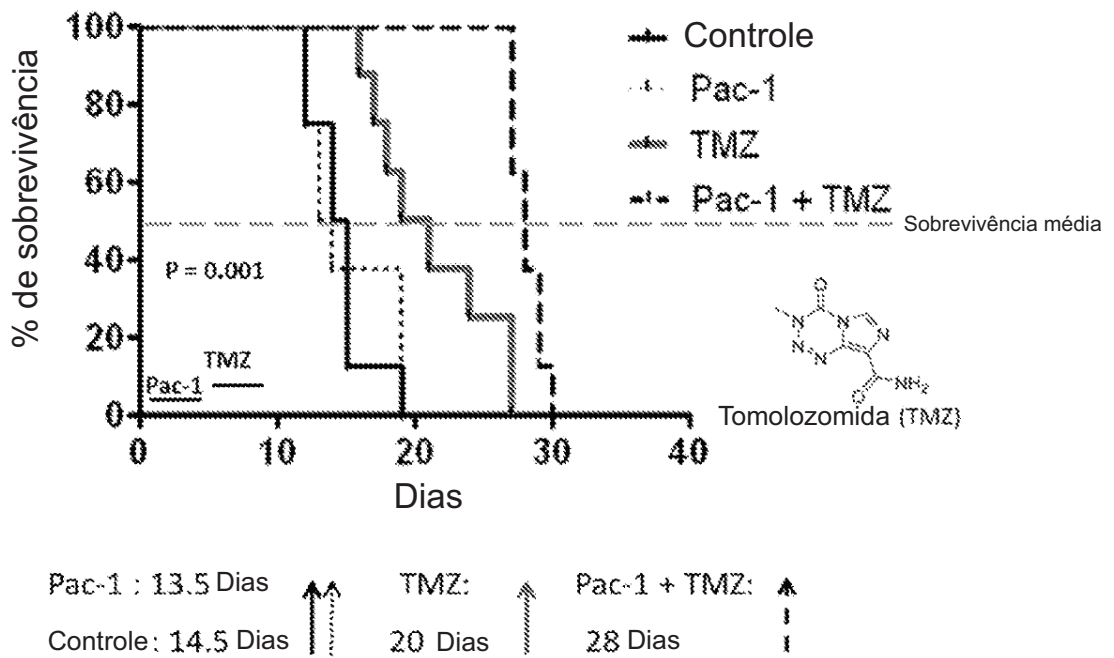


FIG. 1

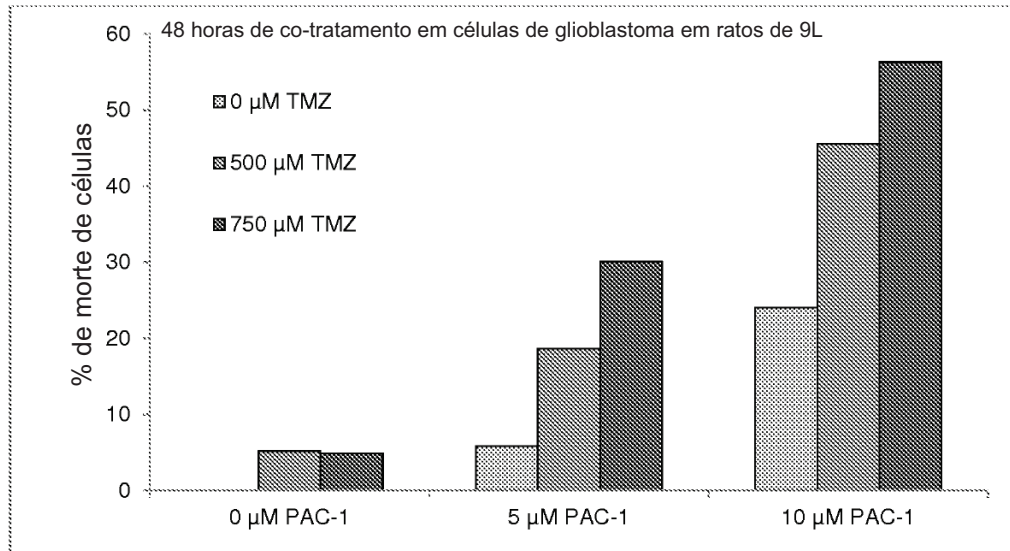


FIG. 2A

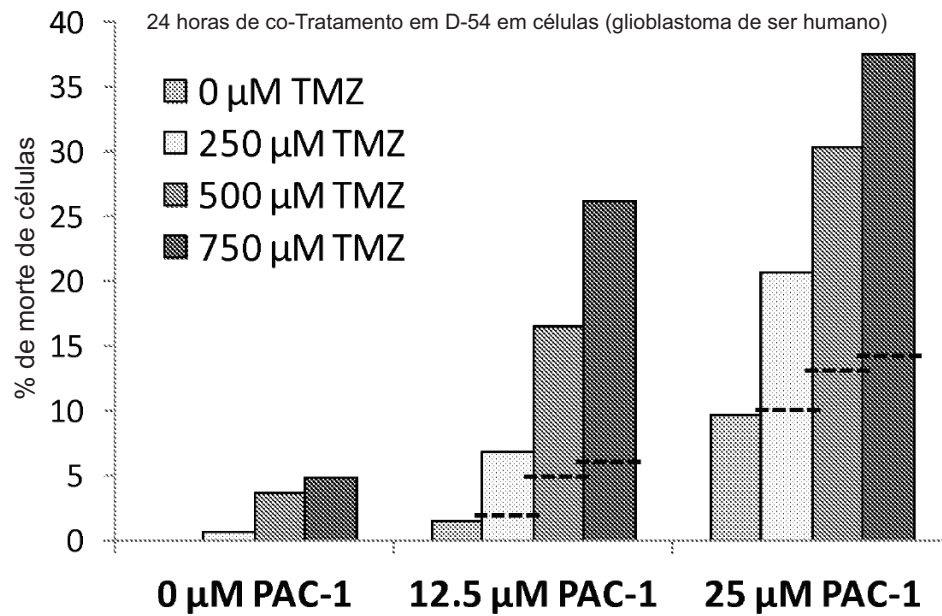


FIG. 2B

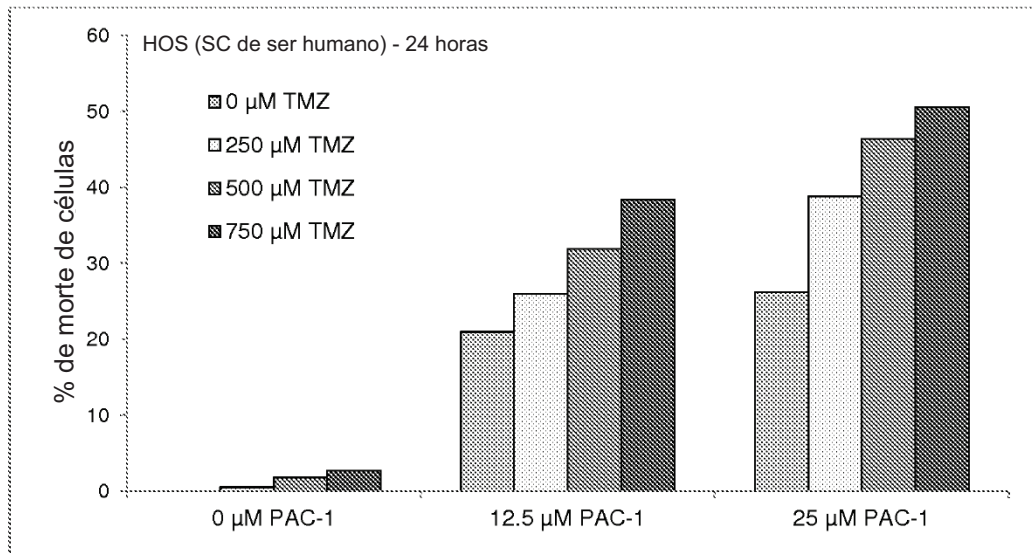


FIG. 3A

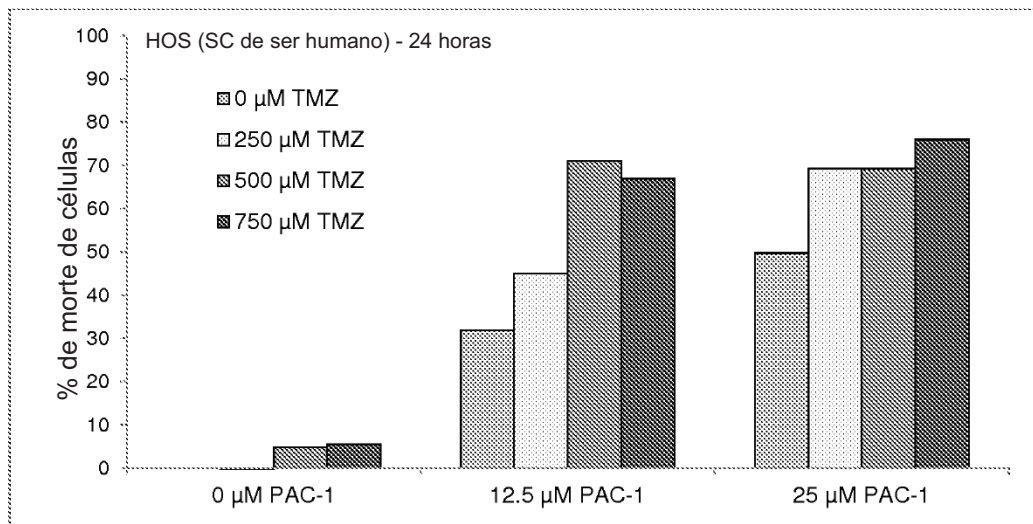


FIG. 3B

PAC-1 sinergiza com TMZ para prolongar em um modelo de camundongo de osteossarcoma metastático

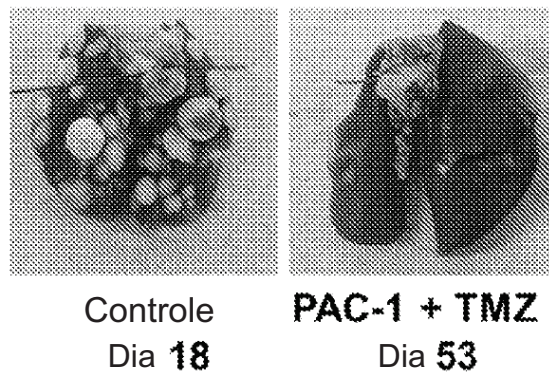
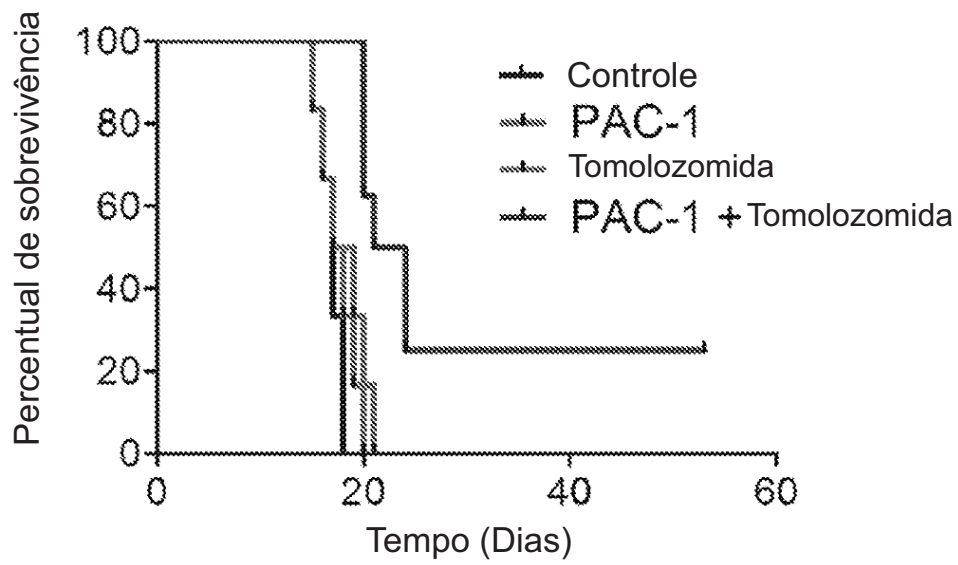


FIG. 4