



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

(21) **PI0708307-6 A2**

(22) Data de Depósito: 28/02/2007
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/08 2006.01
A61K 31/00 2006.01
A61P 35/00 2006.01

(54) Título: **COMBINAÇÃO FARMACÊUTICA PARA ADMINISTRAÇÃO SIMULTÂNEA, SEPARADA OU SEQUENCIAL E USOS DE COMBINAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE UM INIBIDOR DO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO SOBRE OS SUBSTRATOS DE CK2 E UM CITOSTÁTICO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL**

(30) Prioridade Unionista: 28/02/2006 CU 2006-0049

(73) Titular(es): Biorec B. V., Centro De Ingeniería Genética Y Biotecnología

(72) Inventor(es): Aniel Sánchez Puente , Arielis Rodríguez Ulloa , Boris Ernesto Acevedo Castro , Daniel Eduardo Gomez , Fernando, Daniel, Alonso, Jeovanis Gil Valdés , Jorge Fernández de Cossio Dorta Duque, Lila Rosa Castellanos Serra , Luis Javier González López , Lázaro Hiram Betancourt Núñez , Silvio Ernesto Perea Rodríguez , Vladimir Besada Pérez , Yassel Ramos Gómez , Yasser Perera Negrín , Lázaro Hiram Betancourt Núñez

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

(86) Pedido Internacional: PCT CU2007000010 de 28/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/098719 de 07/09/2007

(57) Resumo: COMBINAÇÃO FARMACÊUTICA PARA ADMINISTRAÇÃO SIMULTÂNEA, SEPARADA OU SEQUENCIAL E USOS DE COMBINAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE UM INIBIDOR DO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO SOBRE OS SUBSTRATOS DE CK2 E UM CITOSTÁTICO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL A presente invenção se refere a uma combinação farmacêutica que inclui um inibidor da fosforilação da Caseína Quinase 2 (denominado P 15) e os citostáticos usados na quimioterapia do câncer os quais são administrados simultâneos, separados ou sequencialmente. Os citostáticos preferidos são as platinas, taxanos, alcalóides da Vinca, 5-fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida, etoposide, mitomicina C, imatinib, iressa e o velcade (vortezomib). A sinergia entre o peptídeo P 15 e os compostos químicos anticancerígenos faz com que a concentração eficaz de cada citostático na combinação esteja entre uma e duas ordens de magnitude menor do que a correspondente aos citostáticos sozinhos. Conseqüentemente, a combinação descrita na invenção tem uma toxicidade muito menor que a reportada para os citostáticos anticancerígenos o qual representa uma vantagem crucial para seu uso no tratamento do câncer. Adicionalmente, a combinação administrada de maneira seqüencial produz a quimiossensibilização de tumores refratários aos citostáticos mencionados mediante o pré-tratamento com o peptídeo P 15.



PI0708307-6

1

“COMBINAÇÃO FARMACÊUTICA PARA ADMINISTRAÇÃO
SIMULTÂNEA, SEPARADA OU SEQUÊNCIAL E USOS DE
COMBINAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE UM INIBIDOR DO SÍTIO DE
FOSFORILAÇÃO SOBRE OS SUBSTRATOS DE CK2 E UM
5 CITOSTÁTICO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL”

Campo da técnica:

A presente invenção se refere ao campo da oncologia
molecular e experimental, em particular com a descrição de uma combinação
farmacêutica dirigida ao tratamento e/ou quimiosensibilização de tumores
10 refratários aos citostáticos convencionais.

Estado da técnica anterior

Nas últimas três décadas o emprego de drogas químicas como
citostáticos para o tratamento do câncer constitui uma das opções de
tratamento de primeira linha para alguns tumores sólidos e de origem
15 hematopoiético. Entre as drogas químicas mais comumente usadas na terapia
do câncer se encontram as platinas, taxanos, alcalóides da vinca,
doxorubicina, 5-fluorouracilo e ciclofosfamida entre outros, (Jackman A. L.,
Kaye S., Workman P. (2004) The combination of cytotoxic and molecularly
targeted therapies-can it be done? Drug Discovery Today 1:445-454). No
20 entanto, os resultados clínicos demonstram um baixo índice terapêutico para
este tipo de droga no tratamento do câncer e isto acontece por um benefício
terapêutico marginal somado a um marcado perfil de toxicidade nos pacientes
(Schrader C., et al. M. (2005) Symptoms and signs of acute myocardial
ischemia caused by chemotherapy with paclitaxel (taxol) in a patient with
25 metastatic ovarian carcinoma. Eur J Med Res 10:498-501). Por exemplo,
muitos autores coincidem em que o cisplatino constitui a primeira linha de
tratamento para o câncer do pulmão e no entanto a eficácia mostrada é
somente modesta e se traduz somente em melhoria dos sintomas clínicos da
doença e incremento da sobrevivência em 6 semanas (Grilo R., Oxman A.,

Julian J. (1993) Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 11:1866-1871; Bouquet PJ., Chauvin F., et al. (1993) Polychemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lancet* 342:19-21). Por estas razões, as novas estratégias que se prevêem no futuro para conseguir um tratamento eficaz para o câncer consistem em combinações farmacêuticas baseadas nos citostáticos convencionais como os mencionados anteriormente e novas drogas dirigidas contra alvos moleculares envolvidos na transformação maligna. Na oncologia moderna, existem várias drogas que classificam no termo de drogas dirigidas contra alvos moleculares como são o Gleevec ou Imatinib o qual incide sobre a quinase AbI que tem um papel essencial em Leucemia Mielóide Crônica (Giles J.F., Cortes J.E., Kantarjian H.M. (2005) Targeting the Kinase Activity of the BCR-ABL Fusion Protein in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Current Mol Med* 5:615-623), Iressa que é um composto dirigido contra a quinase associada ao receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico (Onn A., Herbst R.S. (2005) Molecular targeted therapy for lung cancer. *Lancet* 366:1507-1508) e o Velcade ou Vortezomib, que bloqueia a degradação protéica celular mediante sua interação com a maquinaria do proteassoma (Spano J.P., et al. (2005) Proteasome inhibition: a new approach for the treatment of malignancies. *Bull Cancer* 92:E61-66), entre outros. Sobre a base de que os mecanismos dos citostáticos convencionais redundam em seus efeitos antimitóticos inespecíficos, a alternativa de bloqueio direto de alvos moleculares mediante as novas drogas dirigidas, brinda às combinações farmacêuticas uma grande perspectiva para a obtenção de sinergia de efeito antitumoral no tratamento do câncer.

Por outro lado, o fenômeno de resistência aos citostáticos convencionais por parte das células tumorais é reconhecido como a causa primária do fracasso do tratamento do câncer com agentes quimioterapêuticos. Apesar de que a resistência clínica no câncer pode estar

influenciada por uma inadequada concentração de droga no lugar tumoral, outros fatores como os de origem celular têm um papel preponderante na quimiorresistência de muitos tumores. A resistência dos tumores aos citostáticos é um fenômeno multifatorial que envolve múltiplos mecanismos independentes e interrelacionados, entre os quais se encontram os mecanismos de destoxificação intracelular, mudanças na resposta celular, tolerância ao estresse, e defeito nas rotas de sinalização de apoptose (Luqmani A. (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ. Pract* 14:35-48). Dentre as proteínas fundamentais que mediam no mecanismo de destoxificação intracelular vinculado à resistência ao citostático se encontram a Glicoproteína-P e a Glutation S-transferase (Saeki T., Tsuruo T., Sato W., Nishikawsa K. (2005) Drug resistance in chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:84-89) (Hara T., et al. (2004) Gluthathione S-transferase P1 has protective effects on cell viability against camptothecin. *Cancer Letters* 203:199-207). Existem outras proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência citados anteriormente e entre as quais se encontram as tubulinas de tipo beta localizadas no citoesqueleto e cujos níveis de abundância se correlacionam diretamente com a resistência do tumor aos taxanos como é o Paclitaxel (Orr G.A., et al. (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22:7280-7295). Em mudança durante a resistência ao cisplatino foram observadas outras proteínas como mediadoras deste fenômeno como são a T-plastina (Hisano T., et al. (1996) Increased expression of T-plastin gene in cisplatin-resistant human cancer cells: identification by mRNA differential display. *FEBS Letters* 397:101-107), a Proteína de Resposta Térmica (HSP70) e (HSP90) (Jaattela M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248:30-43) e o Fator de Transcrição YB1 (Fujita T., et al. (2005) Increased nuclear localization of transcription fator Y-box binding protein accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer tpreatreated with paclitaxel.

Clin Cancer Res 11:8837-8844). Adicionalmente, no fenômeno de resistência de tumores aos citostáticos lhe atribuíram um papel essencial à rota de Glicólise e síntese de piruvato a qual foi encontrada exacerbada em células tumorais quimiorrefratárias (Boros L.G., et al. (2004) Use of metabolic pathway flux information in targeted cancer drug design. Drug Disc. Today 1 :435-443).

Referências de diferentes grupos no mundo indicam outra série de proteínas vinculadas com a inibição de apoptose e incremento da sobrevivência das células tumorais e as quais em princípio contribuem no fenômeno da quimiorresistência de tumores. Tal é o exemplo da Nucleofosmina a qual tem um papel essencial na promoção do ciclo celular, inibição de apoptose e constitui um marcador de mau prognóstico em câncer (Ye K. (2005) Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. Cancer Biol Ther 4:918-923), e a enzima CK2 que tem um papel determinante no incremento da sobrevivência e resistência de células tumorais à apoptose (Tawfic S., Yu S., Wang H., Faust R., Davis A., Ahmed K. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. Histol. Histopathol. 16:573-582). Achados de diferentes grupos no mundo confirmaram a existência de níveis elevados de CK2 em diversos tumores sólidos de origem epitelial em ordens entre 3 e 7 vezes com respeito ao tecido normal (Tawfic S., Yu S., et al. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. Histol Histopatol. 16:573-582; Faust R. A., Gapany M., et al. (1996) Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation. Cancer Letters 101:31-35), além do que a atividade de fosforilação por esta enzima é um evento celular importante na transformação maligna e constitui um marcador de progressão do tumor (Seldin D.C., Leder P. (1995) Casein Kinase II α transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. Science 267:894-897). Assim mesmo, de conotado implicação para o processo de desenvolvimento

do câncer foram os achados que demonstram que a fosforilação mediada por CK2 constitui um sinal forte para a proteção frente ao fenômeno de apoptose, razão pela qual se considera esta enzima como um mediador antiapoptótico na fisiologia celular (Ahmed K., Gerber D.A., Cochet C. (2002) Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. Trends Cell Biol, 12:226-229; Torres J., Rodríguez J., et al. (2003) Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. J Biol Chem, 278:30652- 60).

10 Sobre a base dos achados anteriormente descritos se confirma que a fosforilação mediada por CK2 é um evento bioquímico que constitui um alvo potencial para a intervenção terapêutica do câncer e que inibidores de tal evento, podem constituir candidatos com perspectivas para o tratamento desta entidade. Até o momento diferentes grupos no mundo desenvolveram

15 estratégias para inibir a fosforilação mediada por CK2 com o uso de duas aproximações experimentais: a) A inibição direta da enzima ou b) O bloqueio do lugar de fosforilação dentro do domínio ácido descrito para os substratos de CK2 (patente WO 03/054002 e o trabalho de Perea S.E., et al. (2004) Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide impairing the phosphorylation by the protein kinase CK2. Cancer Res. 64:7127-7129). Em

20 ambos procedimentos, os autores demonstraram o conceito de que a inibição do evento de fosforilação mediado por esta quinase implica à indução de apoptose de células tumorais o que constituem resultados de validação experimental de CK2 como alvo de interesse no desenvolvimento de fármacos

25 para o tratamento do câncer.

Levando-se em conta os avanços da biologia molecular e a proteômica comparativa se conseguiu esclarecer em parte alguns dos mecanismos moleculares envolvidos tanto na transformação maligna como no fenômeno de resistência aos citostáticos. Por este motivo, os desenhos dos

regimes terapêuticos atuais para o tratamento do câncer devem estar dirigidos para combinações de medicamentos suficientemente efetiva e que reduzam ao máximo a toxicidade e a possibilidade do fracasso terapêutico produto do desenvolvimento de quimiorresistência.

5 Portanto, um problema importante na atualidade em relação com a terapia do câncer é conseguir incrementar o índice terapêutico dos citostáticos mediante a redução da dose efetiva e dos efeitos tóxicos inerentes a este tipo de medicamentos, e por outro lado vencer a resistência dos tumores aos citostáticos convencionais.

10 **Explicação da invenção.**

Esta invenção resolve o problema anteriormente mencionado ao proporcionar uma combinação farmacêutica que inclui um inibidor da fosforilação de Ck2 como é o peptídeo P15 e um citostático farmaceuticamente aceitável para a terapia do câncer.

15 No contexto desta invenção, o termo “citostático farmaceuticamente aceitável” inclui todos aqueles compostos químicos usados na quimioterapia do câncer tanto para tumores sólidos como de origem hematopoiético. Os citostáticos preferidos são as platinas (exemplo cisplatino e carboplatino), taxanos (exemplo paclitaxel e docetaxel), alcalóides da Vinca
20 (exemplo vincristina e vinblastina), 5-fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida, etoposide, mitomicina C, imatinib, iressa e o velcade (vortezomib) misturados com excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis.

 O termo inibidor da fosforilação de CK2 inclui também
25 qualquer composto químico ou peptídico que bloqueie tanto à enzima como a seus substratos.

Dependendo das circunstâncias, a determinar em cada caso mediante os usuais ensaios farmacológicos e clínicos, os ingredientes ativos da combinação podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou

sequencialmente. A administração da combinação é possível por via parenteral, tópica e oral.

Outro aspecto da presente invenção se refere ao tratamento e/ou quimiossensibilização de tumores refratários em um mamífero, especialmente o ser humano, que compreende a administração de qualquer uma das combinações farmacêuticas antes mencionadas. Também faz parte da presente invenção o uso dos ingredientes da combinação farmacêutica para a preparação de um medicamento para o tratamento da quimiorresistência de tumores e para a potenciação do efeito antitumoral dos citostáticos mencionados. O exemplo 1 (Tabela 1) ilustra que as combinações da presente invenção produzem um sinergismo de efeito antineoplásico in vitro. Assim, a combinação simultânea de dose sub-ótimas do peptídeo P15 com cisplatino, paclitaxel, doxorubicina, vincristina, etoposide, mitomicina C, 5-fluouracila, imatinib, ou iressa, consegue reduzir a dose eficaz para cada um dos citostáticos mencionados entre uma e duas ordens de magnitude. Entende-se por dose eficaz a dose que produz 50% do efeito desejado, em ensaios de proliferação celular in vitro se conhece também como Concentração Inibitória 50 (CI50). Conseqüentemente, entende-se por dose sub-ótimas as inferiores à CI50. O exemplo 2 ilustra a potenciação do efeito antitumoral in vivo da combinação farmacêutica do peptídeo P15 e cisplatino (Figura 1A), ciclofosfamida (Figura 1B) e mitomicina C (Figura 1C). A combinação farmacêutica consegue produzir um efeito de regressão completa da massa tumoral em um modelo animal relevante de câncer como é o heterotransplante de tumor humano em ratos nus. No entanto, a administração dos ingredientes da combinação farmacêutica como modalidade de monoterapia só produz um efeito discreto de retardo no crescimento tumoral ao compará-lo com o grupo que recebeu tratamento com placebo.

Do mesmo modo, a administração seqüencial dos ingredientes desta combinação farmacêutica permite observar um efeito

quimiossensibilizante do peptídeo P15 sobre tumores tanto em modelos in vitro como in vivo. Entende-se por efeito quimiossensibilizante à redução da dose de citostático necessária para produzir 50% do efeito antitumoral depois de um pré-tratamento do tumor com o peptídeo P15. O exemplo 3 (Tabela 2) ilustra o efeito quimiossensibilizante do peptídeo P15 sobre células tumorais onde se consegue reduzir a dose eficaz dos citostáticos entre uma e duas ordens de magnitude depois de um pré-tratamento das células com o peptídeo P15. Similarmente, os resultados da tabela 3 demonstram que a combinação farmacêutica administrada de maneira seqüencial tem um efeito quimiossensibilizante in vitro sobre células originalmente resistentes a citostáticos. Nesta invenção, entende-se por resistência a citostáticos quando o valor da CI50 do produto em questão ultrapassa o valor de 1000 μ M.

Conseqüentemente, o pré-tratamento com o ingrediente P15 in vivo, produz igualmente um efeito quimiossensibilizante sobre tumores inicialmente resistentes aos citostáticos (exemplo 4) (Figura 2A, 2B, 2C).

O peptídeo P15 (seqüência aminoácida: CWMSPRHLGTC) um dos ingredientes da combinação farmacêutica da presente invenção foi previamente reportado como um inibidor da fosforilação da enzima CK2 (Perea S.E., et al. (2004) Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide impairing the phosphorylation by the protein kinase CK2. Cancer Res. 64:7127-7129). No entanto, a tabela 4 ilustra o efeito regulador inesperado de dito peptídeo sobre um grupo de proteínas em células tumorais, as quais confirmam e explicam tanto a potenciação do efeito antitumoral da combinação farmacêutica quanto o efeito quimiossensibilizante do ingrediente P15. Por exemplo, as proteínas reguladas pelo ingrediente P15 têm um papel essencial no controle da proliferação de células tumorais e a indução de apoptose e estes mecanismos são independentes dos empregados pelo resto dos ingredientes da combinação farmacêutica como os citostáticos preferidos na invenção.

Do mesmo modo, outras proteínas reguladas pelo ingrediente P15 foram envolvidas previamente nos mecanismos de resistência molecular de células tumorais ao tratamento com os citostáticos preferidos nesta invenção. Estes achados inesperados constituem a confirmação a nível molecular do efeito quimiossensibilizante da combinação farmacêutica quando os ingredientes são administrados de maneira seqüencial.

Para o propósito da presente invenção, resulta crucial que as concentrações eficazes de citostáticos na combinação farmacêutica são reduzidos entre uma e duas ordens de magnitude comparada com as observadas para os citostáticos sozinhos. Isto significa que existe uma sinergia entre o inibidor da fosforilação da CK2 e os citostáticos preferidos para a combinação farmacêutica. Desde o ponto de vista prático, esta sinergia também significa que, a toxicidade do medicamento baseado em uma combinação P15 + citostáticos é menor do que a toxicidade de um medicamento baseado em somente citostáticos.

Do mesmo modo, para os propósitos da invenção, o efeito quimiossensibilizante que se manifesta mediante a administração seqüencial dos ingredientes representa uma importante vantagem desta combinação farmacêutica já que permite vencer a resistência freqüentemente observada em tumores sólidos e de origem hematopoiético aos citostáticos preferidos na presente invenção.

Breve descrição das Figuras:

Figura 1: Potenciação do efeito antitumoral da combinação farmacêutica em um modelo animal de câncer: (A) representa os resultados do sinergismo do cisplatino + P15, (B) representa os resultados do sinergismo de ciclofosfamida + P15, (C) representa os resultados do sinergismo in vivo de mitomicin C + P15.

Figura 2: Efeito quimiossensibilizante do peptídeo P15 in vivo: (A) representa o efeito quimiossensibilizante ao cisplatino, (B) ao

paclitaxel e (C) à doxorubicina.

Exposição detalhada de modos de realização / Exemplos

Métodos gerais:

Cultivos celulares: As células H-125 provêm de um

5 Carcinoma do pulmão Humano de Células Não Pequenas e as células SW948 são provenientes de um carcinoma de cólon humano. Ambas linhas celulares foram mantidas no meio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e gentamicina a 50 µg/ml. As condições de incubação foram a 37°C e 5% de CO₂.

10 **Determinação de viabilidade celular:** Para este propósito foram adicionadas 20 µl de uma solução de sal de Tetrazolium (MTS) (Promega) a cada placa de 96 poços que contêm as células semeadas. Depois de 2 horas a 37°C, realizou-se a leitura da absorção a 492 nm. Finalmente, calcularam-se os valores de Concentração Inibitória 50 (CI50) a partir das
15 respectivas curvas de doses- resposta usando um programa denominado “CurveExpert” apropriado para dita análise.

Modelo animal de câncer: O modelo empregado nesta invenção foi baseado no implante de tumores de origem humana em ratos nus (Nu/Nu, BaIBC). Para estes propósitos, foram inoculadas subcutaneamente
20 5x10⁶ células H-125 ressuspensas em solução salina. Uma vez preso o tumor com aproximadamente 30 mm³ de volume se procedeu às diferentes variantes de tratamento descritas posteriormente nos respectivos exemplos da invenção. Para a avaliação do efeito antitumoral, realizou-se medições do volume tumoral em cada animal, o qual foi calculado mediante a formula: V =
25 largura² x comprimento/2.

Análise do perfil protéico em extratos nucleares:

Inicialmente as células H-125 foram tratadas ou não com o ingrediente P15 da combinação farmacêutica da invenção. O tratamento foi realizado durante 40 minutos nas condições de incubação referidas anteriormente. Em seguida,

lavou-se a monocapa celular e as células foram desprendidas com um varredor para esse propósito. Depois de duas lavagens em solução salina a frio, o sedimento celular final foi ressuspenso em 10mM tris-HCl PH 7.5, 0.25M sacarose, 1MM EGTA + coquetel de inibidores de proteases e se
5 procedeu à obtenção da fração protéica nuclear como previamente descrito (González L.J., et al. (2003) Identification of nuclear proteins of small cell lung cancer cell line H82: An improved protocol for the analysis of silver stained proteins. Electrophoresis 24:237-252). Para a análise das proteínas reguladas pelo ingrediente P15, o extrato nuclear foi alternativamente
10 solucionado em géis bidimensionais usando uma faixa de PH entre 4-7 e/ou mediante cromatografia através de Nano-HPLC e posterior Espectrometria de Massas.

A presente invenção se explica através dos seguintes exemplos de realização:

15 **Exemplo 1: Efeito sinérgico da combinação do peptídeo P15 + citostáticos convencionais.**

Avaliou-se o sinergismo de efeito antineoplásico do ingrediente P15 combinado com um grupo de citostáticos em separado nas seguintes condições experimentais. Para este propósito, cultivaram-se as
20 células H-125 em placas de 96 poços na presença do peptídeo P15 em uma faixa de concentrações entre 10-50 μ M. Simultaneamente, adicionou-se os citostáticos referidos na invenção em uma casta de concentrações que abarcou desde 1 até 2000 nM e a incubação se prolongou durante 72 horas. Ao final deste tempo, procedeu-se à revelação da viabilidade celular mediante a adição
25 de 20 μ l de uma solução de Tetrazolium (MTS) que se reduz nas mitocôndrias de células vivas produzindo uma mudança de cor. Finalmente, a absorção a 492 foi medida em cada caso e foram construídas as respectivas curvas doses-resposta. Os valores de concentração de droga eficaz dos citostáticos se referem à dose que produz 50% (CI50) do efeito antineoplásico e foi

calculado em cada caso a partir das curvas doses-resposta e usando o programa de computação adequado para tal propósito (CurveExpert). Como se pode observar na Tabela 1, os valores de doses antineoplásica eficaz ou CI50 para cada citostático se reduzem entre uma e duas ordens de magnitude quando estes se combinam de maneira simultânea com o ingrediente P15 a 10 e 50 μ M. Os resultados destes ensaios demonstram uma potenciação do efeito antineoplásico da combinação farmacêutica composta pelo peptídeo P15 e os citostáticos preferidos nesta invenção.

Tabela 1. Sinergismo de efeito antineoplásico da combinação farmacêutica administrada de maneira simultânea.

Variantes	Citostático só	Citostático + P15 (10 μ M)	Citostático + P15 (50 μ M)
Cisplatino	720 nM	530 nM	40 nM
Paclitaxel	17 nM	8 nM	3 nM
5-Fluoracilo	1200 nM	420 nM	60 nM
Vincristina	856 nM	100 nM	8 nM
Doxorubicina	423 nM	200 nM	76 nM
Ciclofosfamida	2400 nM	1004 nM	85 nM
Mitomicina C	994 nM	93 nM	9 nM
Imatinib	600 nM	200 nM	58 nM
Velcade	2000 nM	1200 nM	700 nM
Iressa	689 nM	174 nM	47 nM

Exemplo 2: Potenciação do efeito antitumoral da combinação farmacêutica em um modelo animal de câncer.

Para este propósito, inoculou-se 5×10^6 de células H-125 por via subcutânea na região dorsal de ratos nus (BaIBc) de 6-8 semanas de idade. Ao final dos 10 dias quando os tumores eram palpáveis (em torno de 30 mm^3), procedeu-se à administração da combinação farmacêutica da invenção. A administração dos ingredientes da combinação foi realizada mediante a administração intraperitoneal do peptídeo P15 dissolvido em solução salina a razão de 0.5 mg/kg/dia durante 5 dias e simultaneamente a inoculação intraperitoneal de 1 mg/kg/dia de citostáticos como o cisplatino (Figura 1A), ciclofosfamida (Figura 1B) e Mitomicin C (Figura 1C) na mesma frequência

de tratamento. Os citostáticos foram também dissolvidos em solução salina. Finalmente, mediu-se os volumes de massa tumoral em função do tempo para avaliar o efeito antineoplásico in vivo. Os resultados mostrados nas Figuras 1A, 1B e 1C indicam que a combinação farmacêutica da invenção produz uma potenciação do efeito antitumoral que se traduz em uma regressão completa da massa tumoral quando ambos ingredientes são administrados de maneira simultânea. Ao contrário, quando os ingredientes são administrados como modalidade de monoterapia, só se observa um efeito antitumoral discreto com respeito ao grupo tratado com o placebo. Desta maneira se demonstra que a interação sinérgica entre os ingredientes da combinação farmacêutica da invenção se manifesta, além disso, in vivo de acordo com os resultados de um modelo pré-clínico relevante e previsível para câncer.

Exemplo 3: Efeito quimiossensibilizante do peptídeo P15 in vitro.

Nestes ensaios, avaliou-se o papel quimiossensibilizante da combinação farmacêutica da invenção quando os ingredientes da mesma são administrados de maneira sequencial. Para este propósito, as células H-125 foram semeadas a razão de 2000 células por poços em placas de 96 poços e ao final de 24 horas foi adicionado o peptídeo P15 a uma concentração de 20 μ M. Em seguida, ao final das 16 horas de incubação com o ingrediente P15 eliminou-se o conteúdo de cada poço e foram realizadas duas lavagens das células com solução salina. Finalmente, adicionaram-se aos poços diferentes citostáticos em uma faixa de dose entre 1 e 2000 nM e a incubação foi prolongada durante mais 72 horas. Ao finalizar os ensaios, a viabilidade celular foi revelada como se indicou previamente no exemplo 1, e igualmente se calcularam os valores de CI50 para os citostáticos. Os resultados da tabela 2 demonstraram que o pré-tratamento destas células tumorais com o ingrediente P15 é capaz de incrementar a sensibilidade das referidas células frente aos citostáticos preferidos na invenção. Adicionalmente, avaliou-se o efeito do pré-tratamento com o ingrediente P15 de células SW948 as quais

são originalmente resistentes ao efeito dos citostáticos. Os resultados demonstraram que o peptídeo P15 igualmente sensibiliza a células tumorais que originalmente são resistentes ao grupo de citostáticos referidos na invenção (Tabela 3). Estes resultados demonstram que ao administrar o ingrediente P15 de forma sequencial com respeito aos citostáticos preferidos da invenção, obtém-se um efeito de sensibilização das células tumorais ao efeito antineoplásico de ditos citostáticos.

Tabela 2. Efeito quimiossensibilizante in vitro da combinação farmacêutica administrada de maneira sequencial

Variantes	Citostático	Citostático + pré-tratamento com P15
Cisplatino	720 nM	20 nM
Paclitaxel	17 nM	0.9 nM
5-Fluorouracilo	1200 nM	105 nM
Vincristina	856 nM	83 nM
Doxorubicina	423 nM	72 nM
Ciclofosfamida	2400 nM	100 nM
Mitomicina C	994 nM	20 nM
Imatinib	600 nM	10 nM
Velcade	2000 nM	370 nM
Iressa	689 nM	63 nM

Tabela 3. Efeito quimiossensibilizante da combinação farmacêutica administrada de maneira sequencial sobre células originalmente quimioresistentes.

Variantes	Citostático	Citostático + pré-tratamento com P15
Cisplatino	$\geq 1000 \mu\text{M}$	120 μM
Paclitaxel	$\geq 1000 \mu\text{M}$	97 μM
Doxorubicina	$\geq 1000 \mu\text{M}$	320 μM

O efeito quimiossensibilizante do ingrediente P15 é, além disso, corroborado pelo perfil protéico que este peptídeo regula nas células tumorais ensaiadas. Para este propósito analisou-se os extratos nucleares provenientes de células H-125 tratadas ou não com o peptídeo P15 durante somente 40 minutos mediante cromatografia de Nano HPLC e posterior Espectrometria de Massas. Os resultados da tabela 4 ilustram um conjunto de proteínas que são reguladas na presença do ingrediente P15 e que por sua natureza funcional confirmam e justificam no nível molecular o papel

quimiossensibilizante deste peptídeo na combinação farmacêutica da invenção.

Tabela 4. Perfil protéico regulado pelo ingrediente P15

Proteínas inibidoras pelo tratamento com o ingrediente P15	fator de inibição
Nucleofosmina	48
T-Plastina	3.34
Proteínas de resposta térmica (HSP-27, -70 e -90)	2.5
Fator transcripcional y-box1	3.33
Precursor de eritropoietina	120
Proteína de transferência de S-glutation	4.87
Complexo ativador de proteassoma	3.35
Enzima E1 ativadora de ubiquitina	2.49
Glicose-6-fosfato isomerase	8.53
Gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase	6.62
Piruvato quinase	8.34
Proteína de tumor controlada tradicionalmente	4.32
Proteínas ativadas pelo tratamento com o ingrediente P15	fator de inibição
Proibitina	2.28
Tubulina alfa-1	3.23
Tubulina beta-2	2.56
Tubulina beta-3	3.23

Exemplo 4: Efeito quimiossensibilizante do peptídeo P15 in vivo.

5 Para este propósito, foram inoculadas 5×10^6 de células SW948 por via subcutânea na região dorsal de ratos nus (BaIBc) de 6-8 semanas de idade. Ao final dos 10 dias quando os tumores eram palpáveis (em torno de 30 mm^3), procedeu-se à administração da combinação farmacêutica da invenção de maneira seqüencial. Primeiro, administrou-se o ingrediente P15 a

10 razão de 0.5 mg/kg/dia durante 5 dias, por via intraperitoneal e em seguida se administrou o cisplatino (Figura 2A), o Paclitaxel (Figura 2B) e a doxorubicina (Figura 2C) a dose de 5 mg/kg/dia durante outros 5 dias. Os resultados demonstram que o pré-tratamento in vivo com o ingrediente P15 do tumor quimiorrefratário é capaz de reverter tal fenômeno de resistência

15 incrementando-se assim a capacidade de resposta do tumor para os

citostáticos avaliados. Estes achados constituem a demonstração da capacidade da combinação farmacêutica da invenção de reverter a resistência de tumores inicialmente quimiorrefratários quando esta é administrada de maneira seqüencial.

REIVINDICAÇÕES

1. Combinação farmacêutica para administração simultânea, separada ou seqüencial, caracterizada pelo fato de que inclui um inibidor da fosforilação da enzima CK2 e um citostático farmacêuticamente aceitável
5 misturados com excipientes ou veículos apropriados.

2. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o inibidor da fosforilação da enzima CK2 é o peptídeo P15 (CWMSPRHLGTC).

3. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1,
10 caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico selecionado do grupo formado por platinas, taxanos e alcalóides derivados do gênero Vinca.

4. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o citostático é o cisplatino e o carboplatino.

15 5. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o citostático é o paclitaxel e o docetaxel.

6. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o citostático é a vincristina e a vinblastina.

20 7. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico como a 5-fluouracila.

8. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico como a doxorubicina.

25 9. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico como a ciclofosfamida.

10. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto

químico como o mitomicin C.

11. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico como o velcade (vortezomib).

5 12. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico como iressa.

10 13. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o citostático consiste em um composto químico como o imatinib.

15 14. Uso de combinações farmacêuticas de acordo com as reivindicações da 1 a 11, para vencer a resistência de tumores sólidos ou de origem hematopoiético a citostáticos farmaceuticamente aceitáveis e caracterizado pelo fato de que os ingredientes da combinação farmacêutica são administrados de forma simultânea, separados ou sequencialmente.

15 15. Uso de combinações farmacêuticas de acordo com as reivindicações da 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o inibidor da fosforilação de CK2 é um composto químico ou peptídico que bloqueia tanto a enzima como a seus substratos.

20 16. Uso de combinações farmacêuticas de acordo com as reivindicações da 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o inibidor da fosforilação de CK2 está expresso em um vetor de DNA.

25 17. Uso de um inibidor da fosforilação da CK2 e um citostático farmaceuticamente aceitável caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento do câncer.

18. Uso de um inibidor da fosforilação da CK2 e um citostático farmaceuticamente aceitável caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores resistentes a citostáticos.

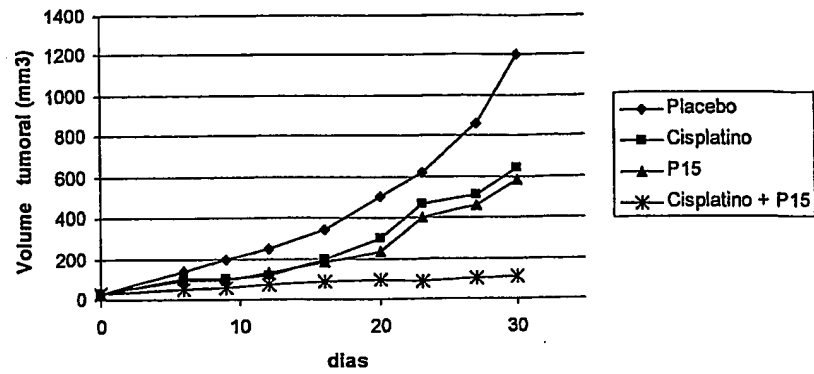
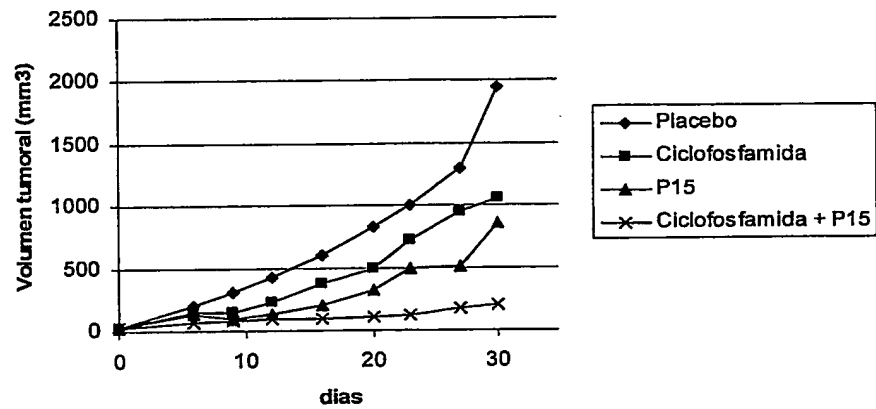
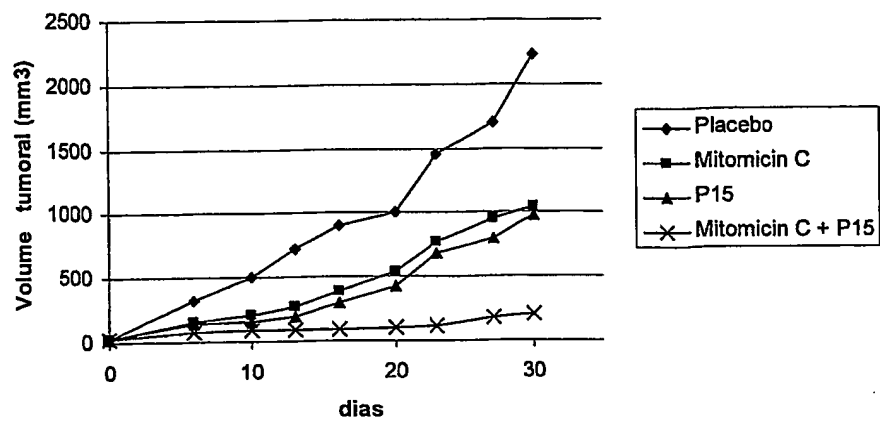
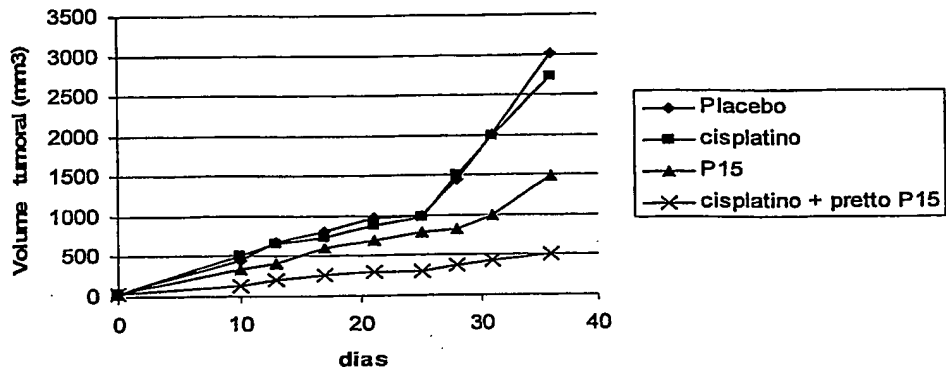
Figura 1**A****Figura 1 A****B****Figura 1B****C****Figura 1C**

Figura 2

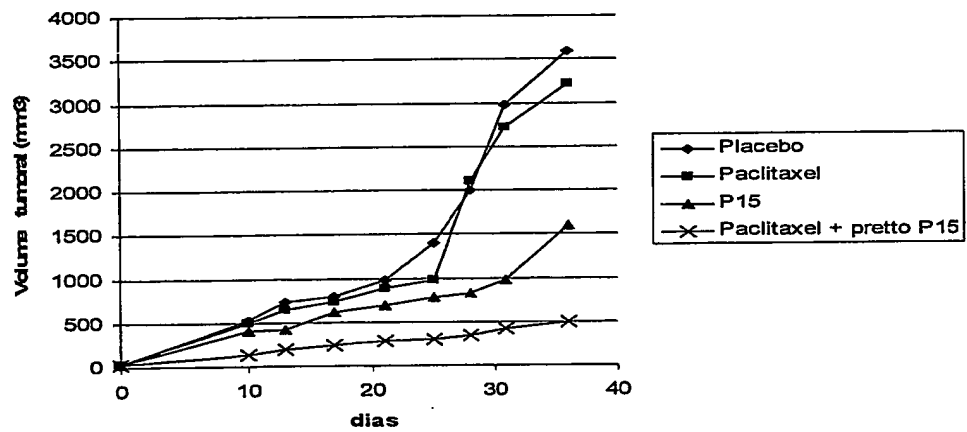
A.

Figura 2A



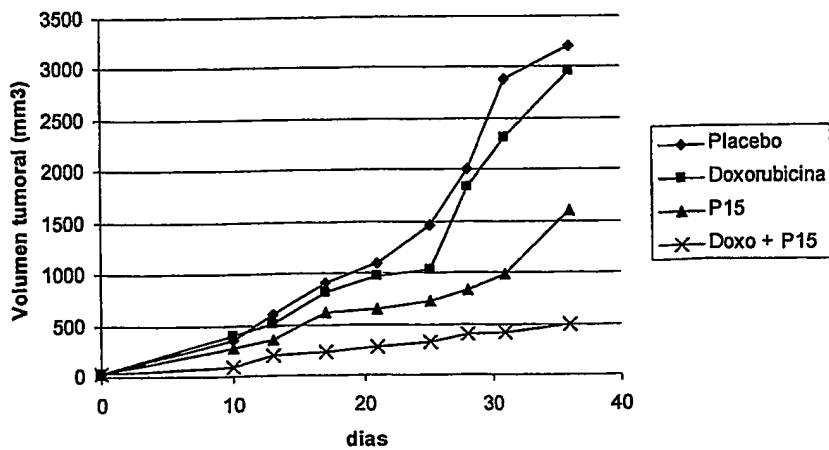
B.

Figura 2B



C.

Figura 2C



RESUMO

“COMBINAÇÃO FARMACÊUTICA PARA ADMINISTRAÇÃO
SIMULTÂNEA, SEPARADA OU SEQUÊNCIAL E USOS DE
COMBINAÇÕES FARMACÊUTICAS E DE UM INIBIDOR DO SÍTIO DE
5 FOSFORILAÇÃO SOBRE OS SUBSTRATOS DE CK2 E UM
CITOSTÁTICO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL”

A presente invenção se refere a uma combinação farmacêutica
que inclui um inibidor da fosforilação da Caseína Quinase 2 (denominado
P15) e os citostáticos usados na quimioterapia do câncer os quais são
10 administrados simultâneos, separados ou sequencialmente. Os citostáticos
preferidos são as platinas, taxanos, alcalóides da Vinca, 5-fluorouracilo,
doxorubicina, ciclofosfamida, etoposide, mitomicina C, imatinib, iressa e o
velcade (vórtexomib). A sinergia entre o peptídeo P15 e os compostos
químicos anticancerígenos faz com que a concentração eficaz de cada
15 citostático na combinação esteja entre uma e duas ordens de magnitude menor
do que a correspondente aos citostáticos sozinhos. Conseqüentemente, a
combinação descrita na invenção tem uma toxicidade muito menor que a
reportada para os citostáticos anticancerígenos o qual representa uma
vantagem crucial para seu uso no tratamento do câncer. Adicionalmente, a
20 combinação administrada de maneira sequencial produz a
quimiossensibilização de tumores refratários aos citostáticos mencionados
mediante o pré-tratamento com o peptídeo P15.