



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

(21) PI 0715073-3 A2



* B R P I 0 7 1 5 0 7 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 03/08/2007

(43) Data da Publicação: 28/05/2013
(RPI 2212)

(51) Int.Cl.:

A61K 31/568
A61K 31/58
A61K 31/704
A61K 31/7048
A61P 1/00
A61P 9/00
A61P 11/00
A61P 17/02
A61P 17/04
A61P 19/02
A61P 19/04
A61P 27/02
A61P 35/04
A61P 37/00

(54) Título: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIR A ANGIOGÊNESE

(30) Prioridade Unionista: 03/08/2006 AU 2006904195

(73) Titular(es): Oncology Research International Limited

(72) Inventor(es): Kenneth Michael Wayte, Michael John Story

(74) Procurador(es): Flávia Salim Lopes

(86) Pedido Internacional: PCT AU2007001092 de
03/08/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/014564de
07/02/2008

(57) Resumo: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE. A presente invenção está relacionada a um método de inibição de angiogênese em um sistema biológico. O método inclui a administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIR A ANGIOGÊNESE

Este pedido reivindica prioridade do pedido provisório de patente australiana N° 2006904195, depositado em 3 de gosto de 2006, cujo teor deve ser considerado como aqui
5 incorporado por esta referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada aos métodos e às composições para a inibição da angiogênese.

A presente invenção também está relacionada aos
10 métodos e às composições para a inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sangüíneos a partir de vasos sangüíneos pré-existentes pelo
15 crescimento e migração de células endoteliais em um processo denominado "brotamento".

O crescimento de células endoteliais é uma etapa crucial no processo angiogênico. Os órgãos possuem limites bem definidos por estruturas acelulares circundantes
20 denominadas membranas basais, que são formadas por um tecido de proteínas da matriz extracelular (ECM), predominantemente lamininas, colágeno do tipo IV e protoglicanos. A angiogênese começa com a erosão da membrana basal que circunda as células endoteliais que
25 foram o lúmen dos vasos sangüíneos. A erosão da membrana basal é desencadeada por enzimas liberadas por células endoteliais e leucócitos. A seguir, as células endoteliais migram através da membrana basal erodida quando induzidas por estimulantes angiogênicos. As células migrantes formam
30 um "broto" a partir do vaso sangüíneo parente. As células

endoteliais migrantes se proliferam, e os brotos se unem para formar alças capilares, formando, dessa forma, um novo vaso sanguíneo.

5 O controle da angiogênese é um processo altamente regulado que envolve as ações de diversos estimuladores e inibidores angiogênicos. Acredita-se que tanto a angiogênese controlada quanto a descontrolada evoluam de forma similar.

10 Sob condições fisiológicas normais, seres humanos e animais só passam por angiogênese em situações restritas muito específicas. Por exemplo, a angiogênese só é observada normalmente na cicatrização de feridas, no desenvolvimento fetal e embrionário, e na formação do corpo lúteo, endométrio e placenta.

15 No entanto, a angiogênese descontrolada ou indesejada está associada a muitas doenças e condições. A indução da angiogênese é uma característica fundamental do câncer, caracterizada pela disseminação de células tumorais por todo o corpo. O processo pelo qual as células tumorais
20 migram de um local primário para um local secundário é denominado "metástase", que é a diferença fundamental entre um crescimento benigno e maligno, e representa o principal problema clínico do câncer. Infelizmente, mais de 50% dos tumores sólidos geraram metástases no momento do
25 diagnóstico.

As evidências para o papel da angiogênese no crescimento tumoral são extensas, e é geralmente aceito que o crescimento de qualquer tumor sólido é criticamente dependente desse processo. A angiogênese tem um papel
30 fundamental nos dois estágios do desenvolvimento tumoral.

Em primeiro lugar, a angiogênese é necessária para que uma massa tumoral cresça além de um tamanho de poucos milímetros. Sem a formação de nova vasculatura, as células na massa tumoral não receberão suprimento sanguíneo
5 suficiente para se desenvolver além desse pequeno tamanho. No entanto, após o início da vascularização do tumor, a massa tumoral pode então se expandir.

A vascularização do tumor também tem participação significativa no desenvolvimento de tumores secundários. A
10 vascularização do tumor permite que as células tumorais penetrem na corrente sanguínea e circulem por todo o corpo. Após as células tumorais terem deixado o local primário e se estabelecido em um local secundário (metastático), o prosseguimento da angiogênese permite, então, que a massa
15 tumoral secundária cresça e se expanda. Portanto, a prevenção da angiogênese pode não apenas levar a uma redução do crescimento de um tumor em seu local primário, mas a prevenção da angiogênese pode também inibir ou reduzir a migração de células tumorais do local primário
20 para outras partes do corpo (metástase).

Além da formação de tumores, há também várias doenças e condições induzidas pela angiogênese ou associadas à angiogênese descontrolada ou indesejada. Essas incluem retinopatia diabética, fibroplasia retrolental, glaucoma
25 neovascular, psoríase, angiofibroma, inflamação imune e não imune (incluindo artrite reumática), propagação de vasos capilares em placas de arteriosclerose, angioma e sarcoma de Kaposi. A angiogênese também pode ocorrer em uma articulação reumatóide, aceleração da destruição articular
30 por permitir um influxo de leucócitos com subsequente

liberação de mediadores inflamatórios.

A angiogênese também tem uma participação central na córnea e na retina de pacientes com certos distúrbios oculares, por exemplo, doença neovascular ocular. Essa
5 doença é caracterizada por invasão de novos vasos sangüíneos nas estruturas do olho como, por exemplo, a retina ou a córnea. É a causa mais comum de cegueira, e está associada a um grande número de doenças do olho. Na degeneração macular relacionada à idade, os problemas
10 visuais associados são causados por um crescimento interno de capilares coroidianos através de defeitos na membrana de Bruch, com proliferação de tecido fibrovascular abaixo do epitélio pigmentar da retina.

A inflamação crônica também pode envolver a
15 angiogênese patológica. Estados de doença como, por exemplo, colite ulcerativa e doença de Crohn, exibem alterações histológicas com o crescimento interno de novos vasos sangüíneos nos tecidos inflamados. Outro papel patológico associado à angiogênese é encontrado na
20 aterosclerose. Foi demonstrado que as placas formadas dentro do lúmen de vasos sangüíneos possuem atividade estimuladora angiogênica.

A angiogênese também está envolvida na reprodução e cicatrização de feridas. Na reprodução, a angiogênese é uma
25 etapa importante na ovulação e também na implantação da blástula após fertilização. A prevenção da angiogênese pode ser usada para induzir amenorréia, para bloquear a ovulação ou para evitar a implantação pela blástula. Na cicatrização de feridas, o reparo excessivo ou fibroplasia pode ser um
30 efeito colateral prejudicial de procedimentos cirúrgicos, e

pode ser causado ou exacerbado por angiogênese. Adesões consistem em uma complicação freqüente de cirurgia, e levam a problemas como, por exemplo, obstrução do intestino delgado.

5 O tratamento atual de doenças que envolvem angiogênese descontrolada ou indesejada é inadequado. Conseqüentemente, há necessidade de novos métodos e composições que inibam a angiogênese descontrolada ou indesejada.

10 A presente invenção surge da determinação de que saponinas esteroidais possuem capacidade antiangiogênica, e está relacionada aos métodos e às composições para a inibição da angiogênese.

Uma referência feita neste pedido a um documento de patente ou a outra matéria que seja considerado como da
15 técnica estabelecida não deve ser considerada como uma admissão de que o documento ou matéria fosse conhecido, ou de que as informações que ele contém fizessem parte do conhecimento geral comum na data de prioridade de qualquer uma das reivindicações.

20 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção surge de estudos sobre habilidade de saponinas esteroidais para inibir a angiogênese. Em particular, verificou-se que saponinas esteroidais possuem a habilidade para inibir a angiogênese em diversos sistemas
25 de modelos *in vivo* e *ex vivo*. Esse achado indica que saponinas esteroidais possuem capacidade antiangiogênica significativa.

Conseqüentemente, a presente invenção fornece um método de inibição da angiogênese em um sistema biológico,
30 o método incluindo a administração ao sistema biológico de

uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A presente invenção também fornece uma composição usada para inibir angiogênese em um sistema biológico, a composição incluindo uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A presente invenção também fornece o uso de uma saponina esteroidal na preparação de um medicamento para a inibição da angiogênese em um sistema biológico.

A presente invenção também fornece uma composição que inclui uma saponina esteroidal e um agente antiangiogênico.

A presente invenção também fornece um método de redução da quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico para obter um nível desejado de inibição da angiogênese, o método incluindo a administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A presente invenção também fornece um método de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais em um sistema biológico, o método incluindo a administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A presente invenção também fornece uma composição usada para inibir a proliferação e/ou migração de células endoteliais em um sistema biológico, a composição incluindo uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A presente invenção também fornece o uso de uma saponina esteroidal na preparação de um medicamento para a inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais em um sistema biológico.

A presente invenção também fornece um método de

redução da quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico para obter um nível desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais, o método incluindo a administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A presente invenção também fornece um produto de combinação que inclui:

- uma saponina esteroidal; e
- um agente antiangiogênico;

a saponina esteroidal e o agente antiangiogênico fornecidos em uma forma para co-administração a um indivíduo ou em uma forma para administração separada a um indivíduo.

A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica que inclui deltonina.

A presente invenção também fornece o uso de deltonina na preparação de um medicamento.

A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica que inclui pró-sapogenina A.

A presente invenção também fornece o uso de pró-sapogenina A na preparação de um medicamento.

A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica que inclui asperina.

A presente invenção também fornece o uso de asperina na preparação de um medicamento.

Vários termos que serão usados ao longo da especificação possuem os significados que serão bem compreendidos por aqueles habilitados na técnica. No entanto, para facilitar a referência, alguns desses termos

serão agora definidos.

O termo "glicosídeo", como usado ao longo da especificação, significa um composto que contém uma porção de sacarídeo (açúcar) (monossacarídeo, dissacarídeo ou polissacarídeo), ligada a um componente de triterpeno ou esteróide ou esteróide alcalóide aglicona (não sacarídeo). Na maioria das vezes, a porção de sacarídeo (açúcar) está ligada na posição C-3 da aglicona, embora outras ligações sejam contempladas dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, os glicosídeos de furostanol, que contêm um sacarídeo anexado à posição C-26, e glicosídeos de espirostanol, são, ambos, subclasses das saponinas esteroidais.

O termo "saponina", como usado ao longo da especificação, significa um glicosídeo, incluindo um sacarídeo (açúcar) anexado à aglicona, geralmente por meio da posição C-3 da aglicona.

O termo "saponina esteroidal", como usado ao longo da especificação, significa um glicosídeo, incluindo uma ou mais unidades sacarídicas (incluindo uma ou mais unidades monossacarídicas, dissacarídicas ou polissacarídicas) anexadas a uma aglicona que não contém um átomo de nitrogênio.

A esse respeito, será subentendido que o termo "saponina esteroidal" inclui, dentro de seu escopo, quaisquer sais ou quaisquer outros derivados dos compostos que são funcionalmente equivalentes em termos de sua habilidade para aumentar a atividade de uma terapia anticâncer.

Uma "aglicona" esteróide também é denominada uma

"genina" ou sapogenina", e os termos podem ser usados de forma intercambiável ao longo da especificação, e todos devem ser compreendidos como significando a porção não sacarídica de uma molécula de saponina.

5 O termo "sacarídeo A-(1→n)-sacarídeo B", como usado ao longo da especificação, significa que o sacarídeo A está ligado por seu C-1 ao C-n do sacarídeo B, n sendo um número inteiro.

Por exemplo, o polissacarídeo com o nome comum
10 "chacotriose" é α -L-ramnopiranosil-(1→2)-[α -L-ramnopiranosil-(1→4)]- β -D-glicopiranosídeo. Uma forma abreviada da nomenclatura de acordo com as recomendações da IUPAC aqui usada é Rha 2, [Rha 4], Glc.

O termo "indivíduo", como usado ao longo da
15 especificação, significa qualquer indivíduo humano ou animal. A esse respeito, será subentendido que a presente invenção inclui, dentro de seu escopo, aplicações veterinárias. Por exemplo, o indivíduo animal pode ser um mamífero, um primata, um animal de criação (por exemplo, um
20 cavalo, uma vaca, um carneiro, um porco ou uma cabra), um animal de companhia (por exemplo, um cachorro, um gato), um animal de laboratório (por exemplo, um camundongo, um rato, um porquinho-da-índia, um pássaro), um animal de importância veterinária ou um animal de importância
25 econômica.

O termo "trata", e variantes destes, como usado ao longo da especificação, devem ser entendidos como significando intervenção terapêutica com uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal. Por exemplo, o termo
30 inclui, dentro de seu escopo, intervenção terapêutica para

ter um ou mais dos seguintes resultados finais: (i) para inibir ou evitar o crescimento de um tumor primário em um indivíduo, incluindo a redução do crescimento do tumor primário após ressecção; (ii) para inibir ou evitar o crescimento e a formação de um ou mais tumores secundários em um indivíduo; (iii) para inibir ou evitar a angiogênese em um indivíduo; (iv) inibir a proliferação e/ou migração de células endoteliais em um indivíduo; (v) para aumentar a expectativa de vida do indivíduo, comparado com o estado não tratado; e (vi) melhorar a qualidade de vida do indivíduo, comparado com o estado não tratado.

O termo "inibir", como usado ao longo da especificação, significa uma redução no progresso de um processo, incluindo qualquer um ou mais do início, velocidade, probabilidade, continuação ou término de um processo.

O termo "angiogênese", como usado ao longo da especificação, significa a geração de novos vasos sangüíneos ("neovascularização"), por exemplo, em um tecido ou órgão.

O termo "sistema biológico", como usado ao longo da especificação, significa qualquer sistema multicelular, e inclui grupos isolados de células até organismos inteiros. Por exemplo, o sistema biológico pode consistir em células em cultura de tecido, um tecido ou órgão, ou todo um indivíduo humano como, por exemplo, um indivíduo humano que sofre os efeitos de angiogênese indesejada ou descontrolada, ou uma doença ou condição associada à angiogênese descontrolada ou indesejada.

O termo "agente antiangiogênico", como usado ao longo

da especificação, significa um agente que possui a capacidade de inibir a angiogênese em um sistema biológico.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

5 A Figura 1 mostra o efeito do aumento da concentração de deltonina sobre o crescimento de vasos de explantes aórticos.

A Figura 2 mostra um exemplo representativo do efeito de DMSO isoladamente sobre explantes aórticos com a utilização de microscopia óptica ou coloração de lectina
10 Fitc-BS-1.

A Figura 3 mostra um exemplo representativo do efeito de 10 μ M de deltonina sobre explantes aórticos com a utilização de microscopia óptica ou coloração de lectina Fitc-BS-1.

15 A Figura 4 mostra o efeito de dioscina, deltonina, trilina, pró-sapogenina A e sorafenib sobre coloração de CD31 de vasos sangüíneos em angio-esponjas, como um indicador do efeito desses compostos sobre o número médio de vasos sangüíneos induzidos.

20 A Figura 5 mostra o efeito de dioscina, deltonina, trilina, pró-sapogenina A e sorafenib sobre o percentual de indução de angiogênese por bFGF em angio-esponjas.

A Figura 6 mostra o efeito de dioscina, deltonina, trilina, pró-sapogenina A e sorafenib sobre o volume
25 sangüíneo em angiocâmaras.

A Figura 7 mostra o efeito de dioscina, deltonina, trilina, pró-sapogenina A e sorafenib sobre a indução de angiogênese por bFGF em angiocâmaras.

DESCRIÇÃO GERAL DA INVENÇÃO

30 Como mencionado acima, em uma modalidade, a presente

invenção fornece um método de inibição de angiogênese em um sistema biológico, o método incluindo a etapa de administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroideal.

5 O sistema biológico nas várias modalidades da presente invenção é qualquer sistema multicelular, e inclui de grupos isolados de células a organismos inteiros. Por exemplo, o sistema biológico pode consistir em células em cultura de tecido, um tecido ou órgão, ou todo um indivíduo
10 humano sofre os efeitos de angiogênese indesejada ou descontrolada, ou uma doença ou condição associada à angiogênese descontrolada ou indesejada.

A esse respeito, será observado que o sistema biológico é qualquer sistema biológico no qual a
15 angiogênese esteja ocorrendo, ou no qual a angiogênese pode ocorrer.

Em uma modalidade, o sistema biológico é um indivíduo humano ou animal. Em uma modalidade específica, o sistema biológico é um indivíduo humano ou animal no qual a
20 angiogênese está associada a uma doença ou condição que seja causada por angiogênese indesejada ou descontrolada.

Por exemplo, o sistema biológico pode ser um indivíduo humano ou animal que sofre de, ou susceptível à, angiogênese associada à formação ou expansão de tumores
25 sólidos, angiofibroma, neovascularização corneana, neovascularização retiniana/coroidiana, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, malformações arteriovenosas, artrite, artrite reumatóide, osteoartrite, artrite psoriática, lúpus, distúrbios do
30 tecido conjuntivo, síndrome de Osler-Weber, placas

ateroscleróticas, psoríase, granuloma piogênico, fibroplasias retrolentais, esclerodermia, granulações, hemangioma, tracoma, articulações hemofílicas, adesões vasculares, cicatrizes hipertróficas, doenças ou condições associadas à inflamação aguda ou crônica, doenças ou condições associadas à inflamação crônica do pulmão, incluindo asma, sarcoidose, doenças inflamatórias do intestino, doença de Crohn ou colite ulcerativa.

Em uma modalidade, a presente invenção pode ser usada para evitar e/ou tratar câncer em um indivíduo.

Em outra modalidade, a presente invenção pode ser usada para evitar o crescimento de um tumor primário e/ou secundário, e inibição e/ou prevenção de metástases.

Exemplos de cânceres incluem carcinoma, câncer de bexiga, câncer ósseo, tumores cerebrais, câncer de mama, câncer cervical, câncer cólon-retal, incluindo câncer do cólon, reto, ânus e apêndice, câncer do esôfago, doença de Hodgkin, câncer renal, câncer da laringe, leucemia, câncer hepático, câncer do pulmão, linfoma, melanoma, verrugas e nevos displásicos, mieloma múltiplo, câncer muscular, linfoma não Hodgkin, câncer oral, câncer ovariano, câncer do pâncreas, câncer da próstata, sarcoma, câncer de pele, câncer do estômago, câncer testicular, teratoma, câncer da tireóide e câncer do útero.

O indivíduo nas várias modalidades da presente invenção pode ser um indivíduo humano ou animal. Por exemplo, o indivíduo animal pode ser um mamífero, um primata, um animal de criação (por exemplo, um cavalo, uma vaca, um carneiro, um porco ou uma cabra), um animal de companhia (por exemplo, um cachorro, um gato), um animal de

laboratório (por exemplo, um camundongo, um rato, um porquinho-da-índia, um pássaro), um animal de importância veterinária ou um animal de importância econômica.

Em uma modalidade, o indivíduo é um indivíduo humano.

5 As saponinas são convencionalmente divididas em três classes principais: (i) glicosídeos de triterpeno; (ii) glicosídeos esteroidais; e (iii) alcalóide glicosídeos esteroidais. Todos têm em comum a adesão de uma ou mais unidades de açúcar à aglicona, geralmente na posição C-3.

10 Saponinas esteroidais são geralmente como descritas em Hostettmann K e Marston A (2005), "Chemistry & pharmacology of natural products: Saponins". Cambridge University Press.

Como aqui discutido previamente, saponinas esteroidais não contêm um átomo de nitrogênio na porção de aglicona.

15 Será observado que a saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção incluem saponinas esteroidais de ocorrência natural e saponinas esteroidais de ocorrência não natural (ou seja, saponinas esteroidais sintetizadas quimicamente). Além disso, também será
20 observado que a saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção também inclui pró-fármacos das saponinas esteroidais, derivados de saponinas esteroidais, incluindo, por exemplo, quaisquer ésteres, cetonas, ácidos carboxílicos, sais, formas substituídas, formas halogenadas
25 ou outras formas contendo heteroátomos, formas insaturadas ou qualquer outro derivado funcional.

A porção sacarídica das saponinas esteroidais nas várias modalidades da presente invenção pode incluir uma ou mais unidades sacarídicas como, por exemplo, uma unidade
30 monossacarídica, uma unidade dissacarídica ou uma unidade

polissacarídica.

Também será observado que a saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção também pode incluir uma aglicona com um sacarídeo anexado a uma ou mais
5 posições da porção de aglicona.

Em uma modalidade, a saponina esteroidal inclui um sacarídeo anexado a uma única posição do componente de sapogenina da saponina esteroidal.

Como discutido acima, a unidade sacarídica pode ser um
10 monossacarídeo, um dissacarídeo ou um polissacarídeo. O sacarídeo pode ser composto por um monossacarídeo adequado como, por exemplo, D-glicose (Glc), L-ramnose (Rha), D-galactose (Gal), ácido D-glicurônico (GlcA), D-xilose (Xyl), L-arabinose (Ara), D-fucose (Fuc), ácido D-
15 galacturônico (GalA). A unidade sacarídica também pode ser um açúcar substituído como, por exemplo, um açúcar amino, um açúcar sulfatado, um açúcar acilado, um açúcar N-acilado e derivados funcionais de qualquer um dos monossacarídeos mencionados anteriormente.

20 Da mesma forma, um dissacarídeo pode ser qualquer combinação de dois monossacarídeos, como descritos acima.

Os polissacarídeos nas várias modalidades da presente invenção podem ser lineares ou ramificados, e incluem qualquer combinação de dois ou mais monossacarídeos,
25 incluindo o monossacarídeo aqui descrito previamente.

Em uma modalidade, o polissacarídeo é composto por 1 a 6 unidades monossacarídicas.

A esse respeito, e como aqui descrito previamente, polissacarídeos são geralmente descritos no contexto do
30 arranjo dos monossacarídeos componentes.

Em uma modalidade, o sacarídeo da saponina esteroidal é composto por 1 unidade monossacarídica. Um exemplo de um monossacarídeo é glicose com o nome químico β -D-glicopiranosídeo, o qual, quando anexado à aglicona diosgenina por meio da posição C-3, possui o nome comum de "trilina".

Em outra modalidade, o sacarídeo da saponina esteroidal é composto por 2 unidades monossacarídicas, ou seja, um dissacarídeo. Um exemplo de um dissacarídeo é Rha 2, Glc com o nome químico α -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo, o qual, quando anexado à aglicona diosgenina por meio da posição C-3, possui o nome comum de "pró-sapogenina A".

Em outra modalidade, o polissacarídeo é composto por 3 unidades sacarídicas, ou seja, um trissacarídeo. Chacotriosídeo é um exemplo comum de uma unidade trissacarídica, em que o grupo glicosil de três sacarídeos possui duas unidades de ramnose ligadas a uma unidade de glicose, a qual, por sua vez, está ligada por meio de uma ligação glicosídica à posição C-3 de uma sapogenina. Chacotriose é α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glicopiranosídeo. Uma forma abreviada da nomenclatura de acordo com as recomendações da IUPAC aqui usada é Rha 2, [Rha 4], Glc.

Da mesma forma, solatriosídeo é um grupo glicosil de três sacarídeos, que possui uma unidade de ramnose e uma unidade sacarídica não ramnose, cada uma ligada a uma terceira unidade sacarídica, a qual, por sua vez, está ligada por meio de uma ligação glicosídica à posição C-3 de uma sapogenina.

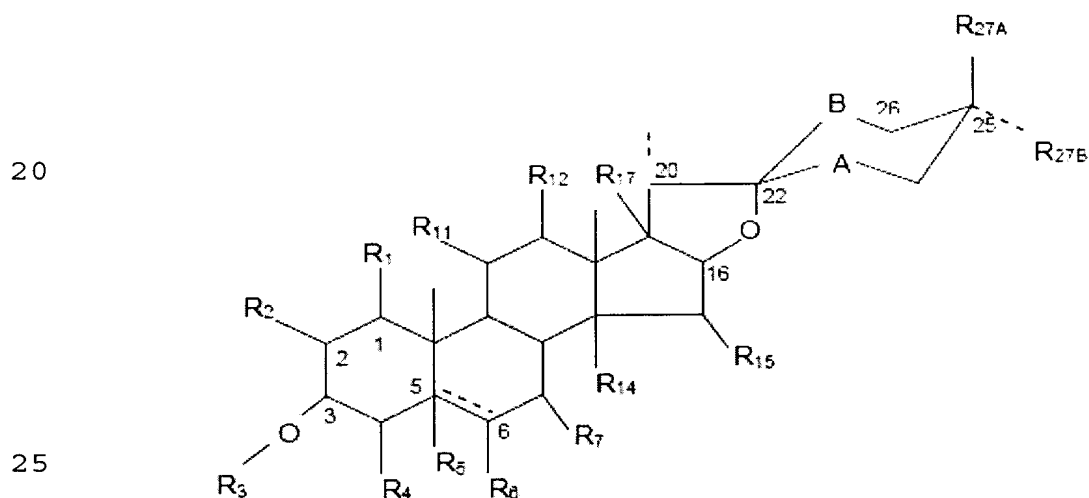
Um exemplo de um tetrassacarídeo é [Rha 4, Rha 4], Rha 2, Glc com o nome químico $[\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow4)]\text{-}\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-glicopiranosídeo}$, o qual, quando anexado à aglicona diosgenina por meio da posição C-3, possui o nome comum de "asperina".

Outro exemplo de tetrassacarídeo é Glc 4, [Xyl 3], Rha 2, Ara, com o nome químico $\beta\text{-D-glicopiranosil}(1\rightarrow4)\text{-}[\beta\text{-D-xilopiranosil}\text{-}(1\rightarrow3)]\text{-}\alpha\text{-L-ramnopiranosil}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-L-arabinosídeo}$.

Como discutido previamente, saponinas esteroidais não contêm um átomo de nitrogênio na porção de aglicona.

Em uma modalidade, a saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção se baseia em uma sapogenina com a Fórmula química I ou II, a seguir:

Fórmula I



em que:

$R_1, R_2, R_4, R_6, R_7, R_{11}, R_{12}, R_{14}, R_{15}$ e R_{17} são independentemente H, OH, =O, grupos éster farmacologicamente aceitáveis ou grupos éter

farmacologicamente aceitáveis;

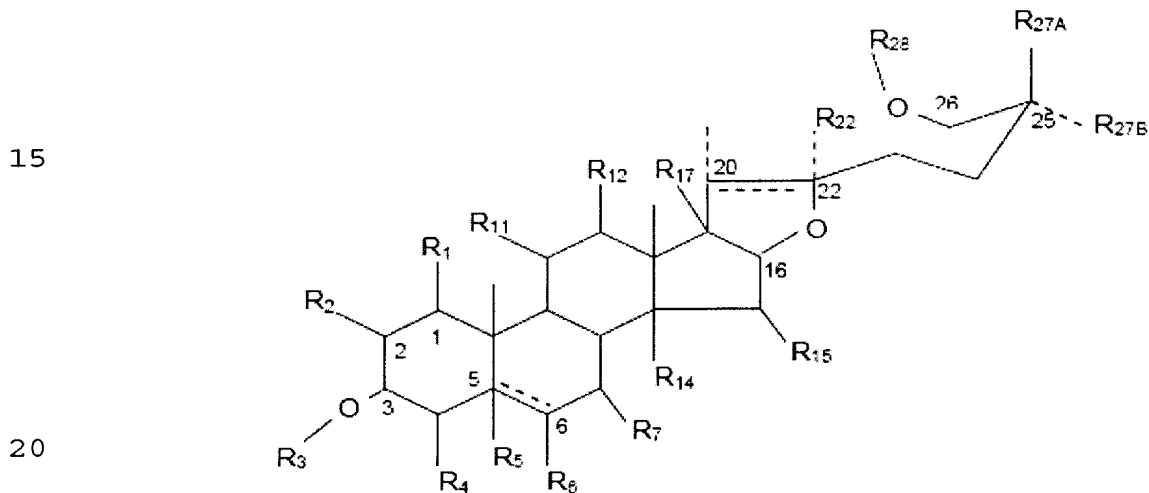
R_5 é H quando C-5,C-6 é uma ligação simples, e nada quando C-5,C-6 é uma ligação dupla;

A é O concomitantemente com B sendo CH_2 , ou B é O concomitantemente com A sendo CH_2 ;

R_{27A} é H concomitantemente com R_{27B} sendo CH_3 , ou R_{27A} é CH_3 concomitantemente com R_{27B} sendo H;

R_3 compreende um grupo glicosil ligado por meio do átomo de oxigênio à sapogenina esteroidal em C-3; ou um sal farmacologicamente aceitável, ou derivado deste.

Fórmula II



em que:

$R_1, R_2, R_4, R_6, R_7, R_{11}, R_{12}, R_{14}, R_{15}$ e R_{17} são independentemente H, OH, =O, grupos éster farmacologicamente aceitáveis ou grupos éter farmacologicamente aceitáveis;

R_5 é H quando C-5,C-6 é uma ligação simples, e nada quando C-5,C-6 é uma ligação dupla;

R_{22} é um grupo hidroxil ou um grupo alcóxil quando C-

20, C-22 é uma ligação simples, ou nada quando C-20, C-22 é uma ligação dupla;

R_{27A} é H concomitantemente com R_{27B} sendo CH_3 , ou R_{27A} é CH_3 concomitantemente com R_{27B} sendo H;

5 R_{28} é H ou um sacarídeo; ou um sal farmaceuticamente aceitável, ou derivado deste;

R_3 compreende um grupo glicosil ligado por meio do átomo de oxigênio à sapogenina esteroidal em C-3; ou um sal farmaceuticamente aceitável, ou derivado deste.

10 Exemplos de sapogeninas esteróides incluem espirostanol agliconas como, por exemplo, diosgenina, iamogenina (neodiosgenina), iucagenina, sarsasapogenina, tigogenina, smilagenina, hecogenina, gitogenina, convalamarogenina, neoruscogenina e solagenina; e
15 furostanol agliconas como, por exemplo, protodiosgenina, pseudo-protodiosgenina, metil protodiosgenina, protoiamogenina e metil protoiamogenina.

Em uma modalidade, a saponina esteroidal é um chacotriosídeo-saponina esteroidal. Em outra modalidade, a
20 saponina esteroidal é um solatriosídeo-saponina esteroidal.

Exemplos de chacotriosídeo-saponinas esteroidais incluem "dioscina", que consiste na sapogenina "diosgenina" ligada por meio da posição C-3 a chacotriose, diosgenina ligada por meio da posição C-3 a outro chacotriosídeo, tigogenina ligada por meio da posição C-3 a um
25 chacotriosídeo, sarsasapogenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo, smilagenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo, iucagenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo, e iamogenina ligada por
30 meio da posição C-3 a um chacotriosídeo.

Exemplos de solatriosídeo saponinas esteroidais incluem "gracilina", que é diosgenina ligada por meio da posição C-3 ao solatriosídeo (Rha 2, [Glc 3], Glc); deltonina (diosgenina ligada por meio da posição C-3 ao solatriosídeo Rha 2, [Glc 4], Glc); diosgenina ligada por meio da posição C-3 a solatriose (Rha 2, [Glc 3], Gal) [nesse contexto, diosgenina ligada a (Rha 2, [Glc 3], Gal) é denominada "diosgenina solatriose"]; diosgenina ligada por meio da posição C-3 a outro solatriosídeo; tigogenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; sarsasapogenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; smilagenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; iucagenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo, e iamogenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo.

Saponinas esteroidais monossacarídicas simples estão disseminadas no reino vegetal. O monossacarídeo geralmente está ligado à aglicona por meio da posição C-3, e exemplos incluem "trilina", que é diosgenina ligada por meio da posição C-3 à glicose. Outras sapogeninas ligadas à glicose por meio da posição C-3 incluem sarsasapogenina, rodeasapogenina e iamogenina. Algumas sapogeninas estão ligadas por meio da posição C-3 a outro monossacarídeo, como, por exemplo, arabinose, por exemplo, ionogenina e convalagenina, ou ligadas por meio da posição C-3 à galactose, e assim por diante.

Exemplos de saponinas esteroidais dissacarídicas incluem sarsasapogenina ligada por meio da posição C-3 a, por exemplo, (Xyl 2, Gal 3); (Glc 2, Glc 3); (Glc 3, Glc 3); smilagenina ligada por meio da posição C-3 a (Glc 2,

Glc 3); (Glc 2, Gal 3); samogenina, tigogenina, gitogenina, aliogenina, ruscogenina, penogenina, cepagenina e diosgenina ligadas por meio da posição C-3 a (Rha 2, Glc 3).

5 Os glicosídeos de diosgenina da espécie *Dioscorea* são de grande interesse comercial como materiais de partida para hormônios esteróides. Glicosídeos de diosgenina e seu isômero C-25 iamogenina estão entre as espirostanol saponinas mais freqüentemente documentadas.

10 Exemplos de espirostanol sapogeninas esteróides de ocorrência natural com uma ligação dupla C-5,C-6 no anel B estão listados na Tabela 1:

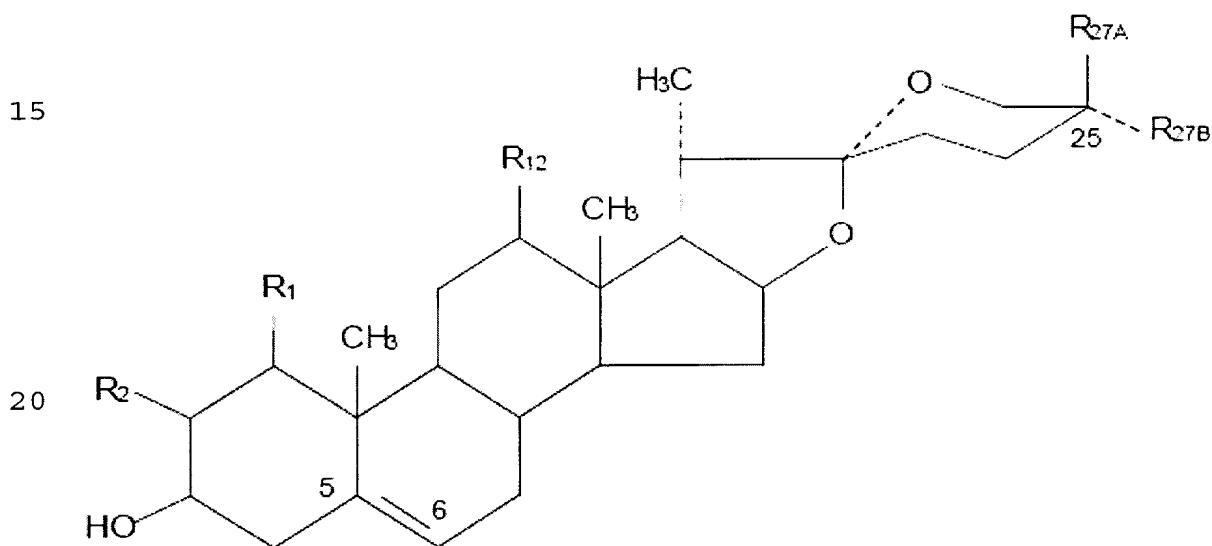


Tabela 1

	R ₁	R ₂	R ₁₂	R _{27A}	R _{27B}
Diosgenina	H	H	H	H	CH ₃
Iamogenina	H	H	H	CH ₃	H
Iucagenina	H	OH	H	H	CH ₃

	R ₁	R ₂	R ₁₂	R _{27A}	R _{27B}
Gentrogenina	H	H	=O	H	CH ₃
Ruscogenina	OH	H	H	H	CH ₃

Exemplos de espirostanol sapogeninas esteróides de ocorrência natural com uma ligação simples C-5,C-6 no anel B estão listados na Tabela 2:

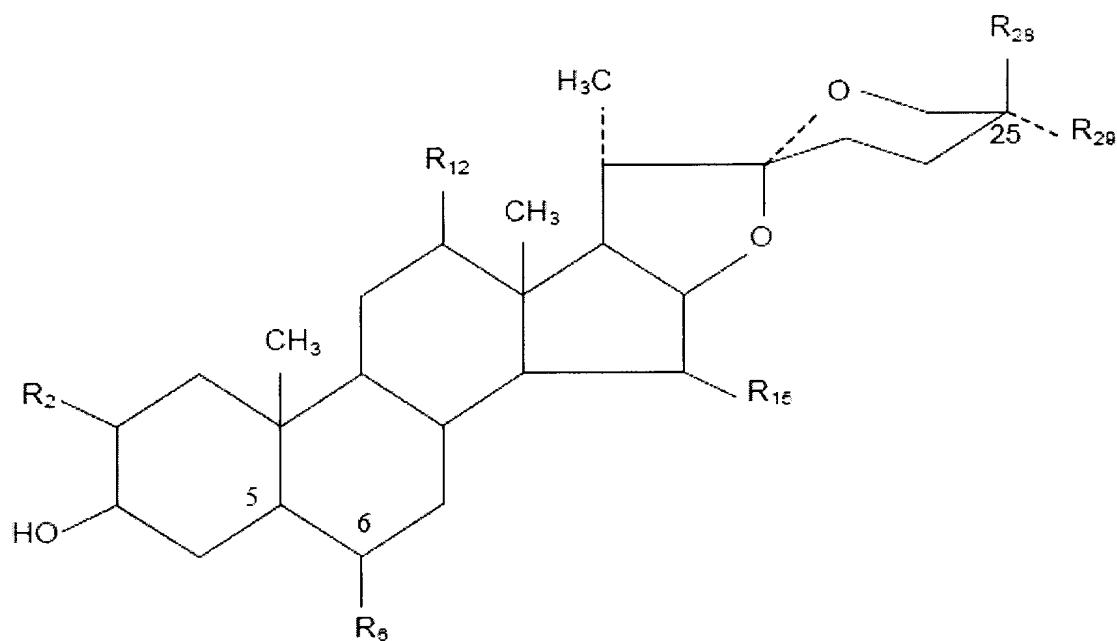


Tabela 2

	R ₂	H ₅	R ₆	R ₁₂	R ₁₅	R ₂₈	R ₂₉
Smilagenina	H	β	H	H	H	H	CH ₃
Tigogenina	H	α	H	H	H	H	CH ₃
Sarsasapogenina	H	β	H	H	H	CH ₃	H
Gitogenina	OH	β	H	H	H	H	CH ₃
Hecogenina	H	α	H	=O	H	H	CH ₃
Clorogenina	H	α	OH (α)	H	H	H	CH ₃

Digitogenina	OH (α)	α	H	H	OH (β)	H	CH ₃
Digalogenina	H	α	H	H	OH (β)	H	CH ₃

Exemplos de furostanol sapogeninas esteróides de ocorrência natural do tipo protoespirostano com uma ligação dupla C-5,C-6 no anel B e uma ligação simples C-20,C-22 no anel E estão listados na Tabela 3:

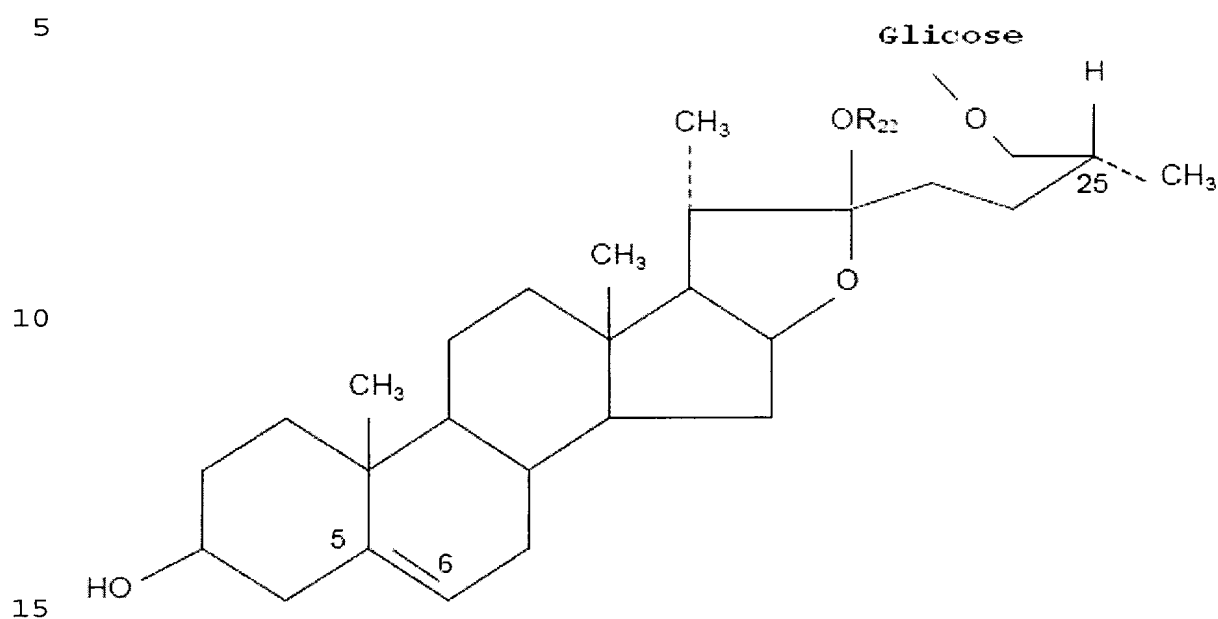


Tabela 3

	R ₂₂
Protodiosgenina	H
Metil protodiosgenina	CH ₃

Um exemplo de uma furostanol sapogenina esteróide de ocorrência natural do tipo protoespirostano com uma ligação simples C-5,C-6 no anel B e uma ligação simples C-20,C-22

20

no anel E é prototigogenina.

Um exemplo de uma furostanol sapogenina esteróide de ocorrência natural do tipo pseudo-espirostano com uma ligação dupla C-5,C-6 no anel B e uma ligação dupla C-20,C-
5 22 no anel E é pseudo-diosgenina.

Um exemplo de uma furostanol sapogenina esteróide de ocorrência natural do tipo pseudo-protoespirostano com uma ligação dupla C-5,C-6 no anel B e uma ligação dupla C-20,C-
22 no anel E é pseudo-protodiosgenina.

10 Em uma modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina diosgenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é dioscina ou gracilina, em que dioscina é a sapogenina diosgenina
15 ligada por meio da posição C-3 a chacotriose (Rha 2, [Rha 4], Glc) e gracilina é diosgenina ligada por meio da posição C-3 ao solatriosídeo (Rha 2, [Glc 3], Glc).

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é deltonina, em que deltonina é a sapogenina diosgenina
20 ligada por meio da posição C-3 a Rha 2, [Glc 4], Glc.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina diosgenina ligada por meio da posição C-3 a solatriose (Rha 2, [Glc 3], Gal). Nesse contexto, diosgenina ligada a (Rha 2, [Glc 3], Gal) é denominada
25 "diosgenina solatriose".

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina diosgenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a
30 sapogenina tigogenina, ligada por meio da posição C-3 a um

sacarídeo.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina sarsasapogenina, ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo.

5 Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina smilagenina, ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina iucagenina, ligada por meio da posição C-3 a um
10 sacarídeo.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é a sapogenina iamogenina, ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo.

Em outra modalidade, a saponina esteroidal é uma
15 saponina esteroidal baseada em furostanol, excluindo convalamarosídeo.

Em uma modalidade específica, a saponina esteroidal é selecionada do grupo que consiste em deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4],
20 Glc), pró-sapogenina A (diosgenina Rha2, Glc) e asperina (diosgenina [Rha 4, Rha 4], Rha 2, Glc).

No caso de deltonina, pró-sapogenina A e asperina, qualquer uma dessas saponinas esteroidais pode ser preparada em uma composição farmacêutica.

25 Conseqüentemente, essas saponinas esteroidais podem ser usadas na preparação de um medicamento.

Um medicamento desse tipo pode ser usado, por exemplo, para um ou mais de inibição do crescimento de uma célula cancerosa; inibição da formação e/ou do crescimento de um
30 tumor primário e/ou secundário; prevenção e/ou tratamento

de um câncer, inibição da angiogênese, inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais, inibição e/ou prevenção de metástases, e redução da quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico
5 para obter um nível desejado de inibição da angiogênese.

Como aqui discutido previamente, a saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção pode ser obtida de fontes naturais, fabricada por processos de síntese, ou como síntese ou modificação parcial aplicada aos compostos
10 ou intermediários de ocorrência natural.

A extração, o isolamento e a identificação da saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção podem ser obtidos por métodos conhecidos na técnica.

Por exemplo, algumas saponinas esteroidais são
15 produzidas a partir de fontes vegetais. Outras fontes de saponinas esteroidais podem ser facilmente obtidas a partir da literatura, por exemplo, como descrito em Hostettmann K. e Marston A. (2005), "Chemistry & pharmacology of natural products: Saponins". Cambridge University Press, capítulos
20 1-3 e 6. Os nomes comuns de saponinas esteroidais foram usados de acordo com o texto acima e com o "Dictionary of Natural Products", Chapman e Hall, CRC, (2004).

A quantidade da saponina esteroidal administrada ao sistema biológico nas várias modalidades da presente
25 invenção não é particularmente limitada, e geralmente estará em uma faixa de forma que o alvo seja exposto a uma concentração de 0,1 μM a 20 μM da saponina esteroidal.

A saponina esteroidal pode ser liberada em uma forma e em uma concentração adequadas para permitir que o agente
30 alcance o local de ação desejado e possua o efeito desejado

como, por exemplo, inibição da angiogênese.

A administração da saponina esteroidal pode estar dentro de qualquer tempo adequado para produzir o efeito desejado. Em um indivíduo humano ou animal, a saponina esteroidal pode ser administrada, por exemplo, por via
5 oral, parenteral, tópica, ou por qualquer outro meio adequado e, portanto, o tempo de trânsito do agente deve ser levado em conta.

Por exemplo, a administração da saponina esteroidal ao
10 indivíduo nas várias modalidades da presente invenção pode ser em um ou mais de antes do início da angiogênese e/ou concomitantemente à ocorrência da angiogênese. Por exemplo, no caso de inibição de angiogênese associada a um câncer sólido, a administração da saponina esteroidal pode ser
15 antes e/ou durante o crescimento de um tumor (tumores primários e/ou secundários), e/ou antes ou depois da ressecção de um tumor (tumores primários e/ou secundários).

A saponina esteroidal nas várias modalidades da presente invenção pode ser administrada ao indivíduo em uma
20 forma adequada.

Em uma modalidade, a saponina esteroidal está na forma de uma composição adequada ao uso para inibir angiogênese.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece uma composição usada para inibir
25 angiogênese em um sistema biológico, a composição incluindo uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A quantidade eficaz da saponina esteroidal a ser administrada ao sistema biológico (por exemplo, um indivíduo) não é particularmente limitada, desde que esteja
30 em uma quantidade e em uma forma que geralmente exiba um

efeito útil ou terapêutico. O termo "quantidade
terapeuticamente eficaz" é a quantidade que, quando
administrada a um indivíduo que necessita de tratamento,
melhora o prognóstico e/ou o estado do indivíduo. A
5 quantidade que pode ser administrada a um indivíduo
dependerá das características específicas da angiogênese a
ser inibida, do câncer que está sendo tratado, do modo de
administração e das características do indivíduo, por
exemplo, saúde geral, outras doenças, idade, sexo, genótipo
10 e peso corporal. Aqueles habilitados na técnica serão
capazes de determinar dosagens apropriadas, dependendo
desses e de outros fatores.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente
invenção fornece o uso de uma saponina esteroidal na
15 preparação de um medicamento para a inibição da angiogênese
em um sistema biológico.

Como aqui discutido previamente, a administração e
liberação da saponina esteroidal pode ocorrer, por exemplo,
pela via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea,
20 intramuscular, oral ou tópica, ou por injeção direta no
local de ação desejado. O modo e a via de administração na
maioria dos casos dependerão do tipo de doença ou condição
que está sendo tratada.

A forma de dosagem, frequência e quantidade de dose
25 dependerá do modo e da via de administração. Tipicamente,
uma composição injetável será administrada em uma
quantidade entre 5 mg/m² e 500 mg/m², geralmente entre 10
mg/m² e 200 mg/m². Tipicamente, uma composição administrada
oralmente será administrada em uma quantidade entre 5 mg e
30 5 g, de preferência entre 50 mg e 1 g.

Por exemplo, uma quantidade eficaz da saponina esteroideal tipicamente varia entre cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal por dia e cerca de 1.000 mg/kg de peso corporal por dia, e em uma forma entre 1 mg/kg de peso corporal por dia e 100 mg/kg de peso corporal por dia.

Como descrito acima, a administração das composições de saponina esteroideal também pode incluir o uso de um ou mais aditivos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo sais farmacêuticamente aceitáveis, aminoácidos, polipeptídeos, polímeros, solventes, tampões, excipientes, conservantes e agentes de volume, levando-se em conta as características físicas, microbiológicas e químicas específicas da saponina esteroideal a ser administrada.

Por exemplo, a saponina esteroideal pode ser preparada em diversas composições farmacêuticas aceitáveis na forma de, por exemplo, uma solução aquosa, uma preparação oleosa, uma emulsão gordurosa, uma emulsão, um pó liofilizado para reconstituição etc., e pode ser administrada como uma injeção intramuscular ou subcutânea estéril e livre de pirogênio ou como injeção em um órgão, ou como uma preparação embebida ou como uma preparação transmucosa através da cavidade nasal, reto, útero, vagina, pulmão etc. A composição pode ser administrada na forma de preparações orais (por exemplo, preparações sólidas como, por exemplo, comprimidos, drágeas, cápsulas, grânulos ou pós; preparações líquidas como, por exemplo, xarope, emulsões, dispersões ou suspensões).

Composições que contêm a saponina esteroideal também podem conter um ou mais conservantes, agentes de tamponamento, diluentes, estabilizantes, agentes quelantes,

agentes de aumento da viscosidade, agentes dispersantes, controladores do pH, agentes de modificação da solubilidade, ou agentes isotônicos farmacologicamente aceitáveis. Esses excipientes são bem conhecidos por aqueles na técnica.

Exemplos de conservantes adequados são ésteres de ácido benzóico de ácido para-hidroxibenzoico, fenóis, álcool feniletílico ou álcool benzílico. Exemplos de tampões adequados são sais de fosfato de sódio, ácido cítrico, ácido tartárico, e semelhantes. Exemplos de estabilizantes adequados são antioxidantes como, por exemplo, acetato de alfa-tocoferol, alfa-tioglicerina, metabissulfito de sódio, ácido ascórbico, acetilcisteína, 8-hidroxiquinolina, e agentes quelantes como, por exemplo, edetato dissódico. Exemplos de agentes de aumento da viscosidade, de suspensão, solubilização ou agentes dispersantes adequados são éteres de celulose substituída, ésteres de celulose substituída, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, polietileno glicólico, carbômero, polioxipropileno glicólico, monooleato de sorbitano, sesquioleato de sorbitano, óleo de rícino de polioxietileno hidrogenado 60.

Exemplos de controladores do pH adequados incluem ácido clorídrico, hidróxido de sódio, tampões, e semelhantes. Exemplos de agentes isotônicos adequados são glicose, D-sorbitol ou D-manitol, cloreto de sódio.

A administração da saponina esteroide também pode ser na forma de uma composição que contém um transportador, diluente, excipiente, agente de suspensão, agente lubrificante, adjuvante, veículo, sistema de liberação,

emulsificante, desintegrante, absorvente, conservante, tensoativo, corante, glidante, antiaderente, ligante, flavorizante, ou adoçante farmacêuticamente aceitável, levando em conta as propriedades físicas, químicas e microbiológicas da saponina esteroidal que está sendo administrada.

Para essas finalidades, a composição pode ser administrada oralmente, parenteralmente, por spray para inalação, por adsorção, absorção, por via tópica, retal, nasal, bucal, vaginal, intraventricular, por meio de um reservatório implantado em forma de formulações de dosagem que contêm veículos farmacêuticamente aceitáveis atóxicos convencionais, ou por qualquer outra forma de dosagem conveniente. O termo "parenteral", como aqui usado, inclui a injeção subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intra-esternal e intracraniana, ou técnicas de infusão.

Quando administrada parenteralmente, a composição normalmente estará em uma forma injetável de dosagem unitária, estéril, livre de pirogênio (solução, suspensão ou emulsão, que pode ter sido reconstituída antes do uso), que é normalmente isotônica em relação ao sangue do receptor, com um veículo farmacêuticamente aceitável. Exemplos dessas formas injetáveis estéreis são suspensões injetáveis aquosas ou oleaginosas estéreis. Essas suspensões podem ser formuladas de acordo com metodologias conhecidas na técnica, com o uso de veículos, agentes dispersantes ou umidificantes, agentes de formação de complexos, polímeros, auxiliares para solubilidade, e agentes de suspensão adequados. As formas injetáveis

estéreis também podem ser soluções ou suspensões injetáveis estéreis em diluentes ou solventes atóxicos parenteralmente aceitáveis, por exemplo, como soluções em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes farmacêuticamente aceitáveis que podem ser empregados, estão água, etanol, glicerol, solução salina, sulfóxido de dimetila, N-metilpirrolidona, dimetilacetamida, solução de Ringer, solução de dextrose, solução isotônica de cloreto de sódio, e solução de Hank. Além disso, óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como solventes ou meios de suspensão. Para essa finalidade, qualquer óleo fixo brando pode ser empregado, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim e óleo de gergelim. Ácidos graxos como, por exemplo, oleato de etila, miristato de isopropila e ácido oléico e seus derivados glicerídicos, incluindo azeite de oliva e óleo de rícino, especialmente em suas versões polioxietiladas, são úteis na preparação de injetáveis. Essas soluções ou suspensões oleosas também podem conter diluentes ou dispersantes de álcool de cadeia longa.

O veículo pode conter aditivos, tais como substâncias que aumentam a solubilidade, isotonicidade e estabilidade química, por exemplo, antioxidantes, tampões e conservantes.

Além disso, a composição que contém a saponina esteroideal pode estar em uma forma a ser reconstituída, antes da administração. Exemplos incluem liofilização, secagem por vaporização, e semelhantes, para produzir uma forma sólida adequada para reconstituição com um solvente farmacêuticamente aceitável, antes da administração.

As composições podem incluir um ou mais tampões, agentes de volume, agentes isotônicos e crioprotetores e lio-protetores. Exemplos de excipientes incluem sais de fosfato, ácido cítrico, açúcares não redutores como, por exemplo, sacarose ou trehalose, álcoois polihidroxí, aminoácidos, metilaminas e sais liotrópicos são preferidos em relação aos açúcares redutores, como maltose ou lactose.

Quando administrada oralmente, a saponina esteroidal normalmente será formulada em formas de dosagem unitária como, por exemplo, comprimidos, drágeas, pastilhas, pó, grânulos, glóbulos, losangos mastigáveis, cápsulas, líquidos, suspensões ou soluções aquosas, ou formas de dosagem similares, com o uso de equipamentos e metodologias convencionais conhecidos na técnica. Essas formulações tipicamente incluem um veículo sólido, semi-sólido ou líquido. Veículos exemplares incluem excipientes como, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, óleo mineral, manteiga de cacau, óleo de teobroma, alginatos, tragacanto, gelatina, xarope, éteres de celulose substituída, monolaurato de polioxietileno sorbitano, hidroxibenzoato de metila, hidroxibenzoato de propila, talco, estearato magnésio, e semelhantes.

Um comprimido pode ser feito por compressão ou moldagem da saponina esteroidal opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Os comprimidos compactados podem ser preparados por compressão, em uma máquina adequada, do ingrediente ativo em uma forma que flua livremente como, por exemplo, como um pó ou grânulos, opcionalmente misturado com um agente ligante,

lubrificante, diluente inerte, tensoativo ou dispersante. Os comprimidos moldados podem ser feitos por moldagem em uma máquina adequada, uma mistura do ingrediente ativo em pó e um veículo adequado umedecido com um diluente líquido
5 inerte.

A administração da saponina esteroidal também pode utilizar tecnologia de liberação controlada.

Para administração tópica, a composição pode estar na forma de uma solução, spray, loção, creme (por exemplo, um
10 creme não iônico), gel, pasta ou pomada. Alternativamente, a composição pode ser liberada por meio de um lipossomo, nanossomo, ribossomo ou veículo nutri-difusor.

Como aqui discutida previamente, a quantidade eficaz da saponina esteroidal a ser administrada não é
15 particularmente limitada, desde que esteja em uma quantidade e em uma forma que geralmente exibam um efeito farmacologicamente útil ou terapêutico.

A administração da saponina esteroidal pode ainda incluir a administração de um agente antiangiogênico,
20 incluindo anticorpos anti-VEGF, incluindo anticorpos humanizados e quiméricos, aptâmeros anti-VEGF e oligonucleotídeos anti-senso, angiostatina, endostatina, interferons, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinóico, e inibidores teciduais de metaloproteinase-2 e -
25 9.

A via de administração, a dose e os regimes de tratamento de agentes antiangiogênicos podem ser determinados por aqueles habilitados na técnica. Agentes antiangiogênicos e seu uso são geralmente como descritos em
30 "Biotherapy: A comprehensive Overview" (2001) Segunda

Edição, ed. By Paula Trahan Rieger, Jones e Bartlett Publishers International.

A inibição da angiogênese no sistema biológico pode ser determinada por um método adequado conhecido na técnica, por exemplo, o aparecimento retardado de estruturas neovasculares, o desenvolvimento mais lento de estruturas neovasculares, a ocorrência diminuída de estruturas neovasculares, a gravidade mais lenta ou diminuída de efeitos da doença dependentes da angiogênese, interrupção do crescimento angiogênico ou regressão de crescimento angiogênico prévio.

A determinação da habilidade da saponina esteroidal para inibir a angiogênese pode ser feita por qualquer ensaio de medida da angiogênese adequado que seja bem conhecido na técnica. Por exemplo, pode ser usado um modelo de explante aórtico em camundongo.

Alternativamente, pode ser realizado um ensaio de membrana corioalantóica (CAM) de galinha ou um modelo de neovascularização corneana. A habilidade da saponina esteroidal para inibir a angiogênese pode ser determinada pela extensão da inibição da angiogênese no embrião de galinha ou pela extensão da inibição da angiogênese em um modelo de neovascularização corneana.

Por exemplo, a habilidade de uma saponina esteroidal para inibir a angiogênese em um ensaio de membrana corioalantóica de galinha pode ser testada por contato da membrana corioalantóica com a saponina esteroidal aplicada a um disco de metilcelulose. Para o modelo de neovascularização corneana, a saponina esteroidal pode ser aplicada como uma composição tópica contendo a saponina

esteroidal à córnea, a córnea sendo arranhada e inoculada com um agente para induzir neovascularização.

Outro método para estudar a angiogênese é a implantação subcutânea de várias esponjas artificiais (ou seja, álcool polivinílico, gelatina) em animais. A saponina esteroidal a ser avaliada pode ser injetada diretamente nas esponjas, que são colocadas no animal. A neovascularização das esponjas é avaliada histologicamente, morfometricamente (densidade vascular), bioquimicamente (teor de hemoglobina) ou por medida da taxa de fluxo sanguíneo na vasculatura da esponja com o uso de um traçador radioativo.

Também foram desenvolvidos vários modelos de tumor em animais para testar a atividade antiangiogênica de compostos de teste. Em muitos casos, são enxertadas células tumorais subcutaneamente, e o tamanho do tumor é determinado em intervalos de tempo regulares. Células tumorais freqüentemente usadas incluem células de glioma de rato C6, de melanoma B16BL6, de LLC e de carcinoma Walker 256.

Contempla-se também que a saponina esteroidal da presente invenção será adequada para uso para reduzir a quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção também fornece um método de redução da quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico para obter um nível desejado de inibição da angiogênese, o método incluindo a etapa de administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A quantidade eficaz da saponina esteroidal a ser administrada não é particularmente limitada, desde que esteja dentro de uma quantidade que geralmente exiba um efeito farmacologicamente útil para reduzir a quantidade de agente necessária para obter um nível desejado de inibição da angiogênese no sistema biológico.

A administração da saponina esteroidal pode estar dentro de qualquer tempo adequado para produzir o efeito desejado de redução da quantidade de um agente administrada a um sistema biológico necessária para obter um nível desejado de inibição da angiogênese no sistema biológico. Como aqui discutido previamente, em um indivíduo humano ou animal, a saponina esteroidal pode ser administrada, por exemplo, por via oral, parenteral, tópica ou por qualquer outro meio adequado e, portanto, o tempo de trânsito do fármaco deve ser levado em consideração.

Como aqui descrito previamente, exemplos de agentes antiangiogênicos incluem anticorpos anti-VEGF, incluindo anticorpos humanizados e quiméricos, aptâmeros anti-VEGF e oligonucleotídeos anti-senso, angiostatina, endostatina, interferons, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinóico e inibidores teciduais de metaloproteinase-2 e -9.

A esse respeito, a quantidade do agente antiangiogênico necessária para obter um nível desejado de inibição da angiogênese será determinada empiricamente por um método conhecido na técnica e, dessa forma, dependerá do nível desejado de angiogênese a ser inibida, da idade e do peso corporal do indivíduo, e da frequência de administração.

A administração do agente antiangiogênico será em uma forma adequada e dentro de um tempo adequado para produzir o efeito desejado de inibição de angiogênese até o nível desejado. Métodos para formulação e administração de
5 agentes antiangiogênicos são conhecidos na técnica.

A administração da saponina esteroidal pode ocorrer ao mesmo tempo e da mesma forma que a administração do agente antiangiogênico. Alternativamente, a administração da saponina esteroidal pode ser separada da administração do
10 agente antiangiogênico, e ocorrer em um tempo farmacologicamente apropriado, antes ou depois da administração do agente.

A presente invenção também fornece um produto de combinação para administração separada ou co-administração
15 de uma saponina esteroidal e de um agente antiangiogênico a um indivíduo para inibir angiogênese. Nesse caso, o produto de combinação inclui a saponina esteroidal para administração separada ao indivíduo em uma forma adequada ou, alternativamente, para co-administração ao indivíduo em
20 uma forma adequada.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece um produto de combinação que inclui uma saponina esteroidal e um agente antiangiogênico, a saponina esteroidal e o agente antiangiogênico fornecidos em uma
25 forma para co-administração a um indivíduo ou em uma forma para administração separada a um indivíduo.

Os componentes do produto de combinação podem ser embalados separadamente ou juntos em recipientes adequadamente esterilizados como, por exemplo, ampolas,
30 garrafas ou frascos, em formas multidoses ou de dosagem

unitária. Os recipientes são tipicamente fechados hermeticamente. São conhecidos na técnica métodos para a embalagem dos componentes.

Como aqui discutido previamente, a co-administração
5 pode ser seqüencial ou simultânea, e geralmente significa que os agentes estão presentes no indivíduo durante um intervalo de tempo especificado. Tipicamente, caso um segundo agente seja administrado dentro da meia-vida do primeiro agente, os dois agentes serão considerados como
10 co-administrados.

A presente invenção pode ser usada para inibir a proliferação e/ou migração de células endoteliais.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de inibição da proliferação e/ou
15 migração de células endoteliais em um sistema biológico, o método incluindo a etapa de administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroideal.

A esse respeito, será observado que o sistema
20 biológico é qualquer sistema biológico no qual a proliferação e/ou migração de células endoteliais esteja ocorrendo ou no qual a angiogênese possa ocorrer.

Em uma modalidade, o sistema biológico é um indivíduo humano ou animal.

25 Em uma modalidade adicional, o sistema biológico é um indivíduo humano ou animal no qual a proliferação e/ou migração de células endoteliais está associada a uma doença ou condição que seja causada por proliferação e/ou migração indesejada ou descontrolada de células endoteliais.

30 Por exemplo, o sistema biológico pode ser um indivíduo

humano ou animal que sofre de ou suscetível a proliferação e/ou migração de células endoteliais associada à formação ou expansão de tumores sólidos, angiofibroma, neovascularização corneana, neovascularização retiniana/coroidiana, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, malformações arteriovenosas, artrite, artrite reumatóide, osteoartrite, artrite psoriática, lúpus, distúrbios do tecido conjuntivo, síndrome de Osler-Weber, placas ateroscleróticas, psoríase, granuloma piogênico, fibroplasias retrolentais, esclerodermia, granulações, hemangioma; tracoma, articulações hemofílicas, adesões vasculares, cicatrizes hipertróficas, doenças ou condições associadas à inflamação aguda ou crônica, doenças ou condições associadas à inflamação crônica do pulmão, incluindo asma, sarcoidose, doenças inflamatórias do intestino, doença de Crohn ou colite ulcerativa.

A célula endotelial é qualquer célula endotelial que esteja passando por proliferação e/ou migração, incluindo uma célula endotelial que passa por proliferação em resposta a um ou mais estímulos angiogênicos em um sistema biológico, ou células endoteliais que possuem a capacidade de passar por proliferação em resposta a um ou mais estímulos angiogênicos. Em uma modalidade, a proliferação e/ou migração de células endoteliais está associada à angiogênese descontrolada ou indesejada no sistema biológico.

Em uma modalidade, a presente invenção pode ser usada para evitar e/ou tratar câncer em um indivíduo, por inibição da proliferação e/ou migração de células

endoteliais.

Exemplos de cânceres incluem carcinoma, câncer de bexiga, câncer ósseo, tumores cerebrais, câncer de mama, câncer cervical, câncer cólon-retal, incluindo câncer do
5 cólon, reto, ânus e apêndice, câncer do esôfago, doença de Hodgkin, câncer renal, câncer da laringe, leucemia, câncer hepático, câncer do pulmão, linfoma, melanoma, verrugas e nevos displásicos, mieloma múltiplo, câncer muscular, linfoma não Hodgkin, câncer oral, câncer ovariano, câncer
10 do pâncreas, câncer da próstata, sarcoma, câncer de pele, câncer do estômago, câncer testicular, teratoma, câncer da tireóide e câncer do útero.

A quantidade da saponina esteroidal administrada ao sistema biológico não é particularmente limitada, e
15 geralmente estará em uma faixa de tal forma que as células endoteliais-alvo sejam expostas a uma concentração de 0,1 μ M a 20 μ M da saponina esteroidal.

A saponina esteroidal pode ser liberada em uma forma e em uma concentração adequadas para permitir que os agentes
20 alcancem o local de ação desejado e possuam o efeito de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais.

A administração da saponina esteroidal pode estar dentro de qualquer tempo adequado para produzir o efeito
25 desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais. Em um indivíduo humano ou animal, a saponina esteroidal pode ser administrada, por exemplo, por via oral, parenteral, tópica, ou por qualquer outro meio adequado e, portanto, o tempo de trânsito do agente deve
30 ser levado em conta.

Por exemplo, a administração da saponina esteroidal ao indivíduo nas várias modalidades da presente invenção pode ser em um ou mais de antes do início da proliferação e/ou migração de células endoteliais, e/ou concomitantemente com a ocorrência da proliferação e/ou migração de células endoteliais.

Como aqui discutido previamente, a saponina esteroidal pode ser formulada e administrada ao indivíduo em uma forma adequada e de uma forma adequada.

Em uma modalidade, a saponina esteroidal está na forma de uma composição adequada ao uso para inibir angiogênese.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece uma composição usada para inibir a proliferação e/ou migração de células endoteliais em um sistema biológico, a composição incluindo uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A quantidade eficaz da saponina esteroidal a ser administrada ao indivíduo não é particularmente limitada, desde que esteja em uma quantidade e em uma forma que geralmente exiba um efeito útil ou terapêutico. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" é a quantidade que, quando administrada a um indivíduo que necessita de tratamento, melhora o prognóstico e/ou o estado do indivíduo. A quantidade que pode ser administrada a um indivíduo dependerá das características específicas da proliferação e/ou migração de células endoteliais a serem inibidas, do modo de administração e das características do indivíduo, tais como saúde geral, outras doenças, idade, sexo, genótipo e peso corporal. Aqueles habilitados na técnica serão capazes de determinar dosagens apropriadas,

dependendo desses e de outros fatores.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece o uso de uma saponina esteroidal na preparação de um medicamento para a inibição da
5 proliferação e/ou migração de células endoteliais em um sistema biológico.

Como aqui discutido previamente, administração e liberação da saponina esteroidal podem ser, por exemplo, pela via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea,
10 intramuscular, oral ou tópica, ou por injeção direta no local de ação desejado. O modo e a via de administração na maioria dos casos dependerão do tipo de doença ou condição que está sendo tratada, como aqui discutido previamente.

A forma de dosagem, freqüência e quantidade de dose
15 dependerá do modo e da via de administração. Tipicamente, uma composição injetável será administrada em uma quantidade entre 5 mg/m² e 500 mg/m², de preferência entre 10 mg/m² e 200 mg/m². Tipicamente, uma composição administrada oralmente será administrada em uma quantidade
20 entre 5 mg e 5 g, de preferência entre 50 mg e 1 g.

Por exemplo, uma quantidade eficaz da saponina esteroidal tipicamente varia entre cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal por dia e cerca de 1.000 mg/kg de peso corporal por dia, e em uma forma entre 1 mg/kg de peso
25 corporal por dia e 100 mg/kg de peso corporal por dia.

Como aqui descrito previamente, a administração das composições da saponina esteroidal também pode incluir o uso de um ou mais aditivos farmacologicamente aceitáveis, incluindo sais farmacologicamente aceitáveis, aminoácidos,
30 polipeptídeos, polímeros, solventes, tampões, excipientes,

conservantes e agentes de volume, levando-se em conta as características físicas, microbiológicas e químicas específicas da saponina esteroidal a ser administrada.

5 Como aqui descrito previamente, composições que contêm a saponina esteroidal também podem conter um ou mais conservantes, agentes de tamponamentos, diluentes, estabilizantes, agentes quelantes, agentes de aumento da viscosidade, agentes dispersantes, controladores do pH, ou agentes isotônicos farmacologicamente aceitáveis. Esses
10 excipientes são bem conhecidos por aqueles com habilidade na técnica.

A administração da saponina esteroidal pode ainda incluir a administração de um agente antiangiogênico, incluindo anticorpos anti-VEGF, incluindo anticorpos
15 humanizados e quiméricos, aptâmeros anti-VEGF e oligonucleotídeos anti-senso, angiostatina, endostatina, interferons, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinóico e inibidores teciduais de metaloproteinase-2 e -
9.

20 A inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais no sistema biológico pode ser determinada por um método adequado conhecido na técnica.

Por exemplo, no caso de proliferação celular, métodos como, por exemplo, contagem de células, incorporação de
25 ^3H timidina, coloração imunoistoquímica para proliferação celular, o aparecimento retardado de estruturas neovasculares, o desenvolvimento mais lento de estruturas neovasculares, a ocorrência diminuída de estruturas neovasculares, a gravidade mais lenta ou diminuída de
30 efeitos da doença dependentes da angiogênese, interrupção

do crescimento angiogênico ou regressão de crescimento angiogênico prévio.

A determinação da habilidade de uma saponina esteroidal para inibir a proliferação de células endoteliais pode ser feita por um ensaio adequado conhecido na técnica, no qual as células são tratadas e é feita a medida da proliferação das células endoteliais. Por exemplo, células endoteliais vasculares umbilicais humanas podem ser cultivadas *in vitro* no meio apropriado, e a proliferação das células endoteliais pode ser medida, por exemplo, por captação de timidina tritiada. A habilidade de um agente para inibir a proliferação em um ensaio desse tipo pode então ser testada por contato das células endoteliais com o agente e determinação da extensão da inibição da proliferação que ocorre em qualquer concentração particular.

No caso de migração de células endoteliais, um ensaio adequado é o "Sistema de Angiogênese: Migração de Células Endoteliais" de BD BioCoat™.

Contempla-se também que a saponina esteroidal da presente invenção seja adequada para uso para reduzir a quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de redução da quantidade de um agente antiangiogênico administrada a um sistema biológico para obter um nível desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais, o método incluindo a etapa de administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroidal.

A quantidade eficaz da saponina esteroidal a ser administrada não é particularmente limitada, desde que esteja dentro de uma quantidade que geralmente exiba um efeito farmacologicamente útil para reduzir a quantidade de agente necessária para obter um nível desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais no sistema biológico.

A administração da saponina esteroidal pode estar dentro de qualquer tempo adequado para produzir o efeito desejado de redução da quantidade de um agente administrada a um sistema biológico necessária para obter um nível desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais no sistema biológico. Como aqui discutido previamente, em um indivíduo humano ou animal, a saponina esteroidal pode ser administrada, por exemplo, por via oral, parenteral, tópica, ou por qualquer outro meio adequado e, portanto, o tempo de trânsito do fármaco deve ser levado em consideração.

Como aqui descrito previamente, exemplos de agentes antiangiogênicos incluem anticorpos anti-VEGF, incluindo anticorpos humanizados e quiméricos, aptâmeros anti-VEGF e oligonucleotídeos anti-senso, angiostatina, endostatina, interferons, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinóico, e inibidores teciduais de metaloproteinase-2 e - 9.

A esse respeito, a quantidade do agente antiangiogênico necessária para obter um nível desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais será determinada empiricamente por um método conhecido na técnica e, dessa forma, dependerá do nível

desejado a ser inibido, da idade e do peso corporal do indivíduo, e da frequência de administração.

A administração do agente antiangiogênico será em uma forma adequada e dentro de um tempo adequado para produzir
5 o efeito desejado de inibição de angiogênese até o nível desejado. Métodos para formulação e administração de agentes antiangiogênicos são conhecidos na técnica.

A administração da saponina esteroidal pode ocorrer ao mesmo tempo e da mesma forma que a administração do agente
10 antiangiogênico. Alternativamente, a administração da saponina esteroidal pode ser separada da administração do agente antiangiogênico, e ocorrer em um tempo farmacologicamente apropriado, antes ou depois da administração do agente.

15 A presente invenção também fornece um produto de combinação para administração separada ou co-administração de uma saponina esteroidal e de um agente antiangiogênico a um indivíduo para inibir a proliferação e/ou migração de células endoteliais. Nesse caso, o produto de combinação
20 inclui a saponina esteroidal para administração separada ao indivíduo em uma forma adequada ou, alternativamente, para co-administração ao indivíduo em uma forma adequada.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a presente invenção fornece um produto de combinação que inclui uma
25 saponina esteroidal e um agente antiangiogênico, a saponina esteroidal e o agente antiangiogênico fornecidos em uma forma para co-administração a um indivíduo ou em uma forma para administração separada a um indivíduo.

Os componentes do produto de combinação podem ser
30 embalados separadamente ou juntos em recipientes

adequadamente esterilizados como, por exemplo, ampolas, garrafas ou frascos, em formas multidoses ou de dosagem unitária. Os recipientes são tipicamente fechados hermeticamente. São conhecidos na técnica métodos para a
5 embalagem dos componentes.

Como aqui discutido previamente, a co-administração pode ser seqüencial ou simultânea, e geralmente significa que os agentes estão presentes no indivíduo durante um intervalo de tempo especificado. Tipicamente, caso um
10 segundo agente seja administrado dentro da meia-vida do primeiro agente, os dois agentes serão considerados como co-administrados.

Métodos para a preparação de composições farmacêuticas são conhecidos na técnica, por exemplo, como descrito em
15 "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.; "U.S. Pharmacopeia: National Formulary", 1984, Mack Publishing Company, Easton, Pa.; e M.E. Aulton, "Pharmaceutics, The Science of Dosage Form Design", 2ª ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002.

20 A liberação terapêutica de biomoléculas é geralmente como descrito em Bladon, C. (2002) "Pharmaceutical Chemistry: Therapeutic Aspects of Biomolecules" John Wiley & Sons Ltd.

DESCRIÇÃO DE MODALIDADES ESPECÍFICAS

25 A seguir, será feita referência aos experimentos que exemplificam os princípios gerais da presente invenção apresentados acima. No entanto, deve-se entender que a descrição a seguir não tem a intenção de limitar a generalidade de descrição acima.

30 **Exemplo 1**

Materiais

Diosgenina, dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc), deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc) e trilina (diosgenina-Glc) foram obtidas comercialmente de Ningbo Hanpharm Biotech Co Ltd, gracilina de ChromaDex, e trilina de Aktin Chemicals. Prosapogenina A: diosgenina Rha2, Glc foram sintetizadas de acordo com o método descrito por Li e cols. *Carbohydr. Res.*, (2001) 331, 1-7. Dioscina e pró-sapogenina A também foram isoladas de *Paris poliphylla*. Sorafenib foi obtido comercialmente.

Exemplo 2

Classificação dos efeitos de deltonina sobre o crescimento de vasos em explantes aórticos

Três machos de camundongos C57BL6/J (com 9 semanas de idade) foram sacrificados por asfixia com CO₂, e o sangue coletado por punção cardíaca com o uso de uma agulha de 29 gauge. A aorta foi então dissecada (do arco aórtico até a interface pleural/peritoneal) e colocada em DMEM gelado suplementado com 10 mM Hepes e penicilina/estreptomicina.

Os tecidos fibrosos e adiposos que circundam a aorta foram removidos por dissecação microscópica, e a aorta teve o sangue lavado com DMEM gelado. A aorta foi então dividida longitudinalmente e cortada em aproximadamente quadrados de 1 mm. Os pedaços individuais de aorta foram embebidos em uma gota (20 µl) de solução de colágeno no fundo de um poço de uma placa de cultura de tecido de 24 poços. As placas foram então colocadas a 37°C/CO₂ 5% por 10 minutos para polimerizar o colágeno em um gel. Meio (0,3 ml) isolado, contendo DMSO ou deltonina em DMSO, foi então adicionado a cada poço para formar um fosso em torno do gel de colágeno.

Somente os 8 poços centrais de cada placa de 24 poços foram usados para culturas de explante para evitar as taxas diferenciais de troca gasosa e de evaporação entre poços de amostra de explante. Os poços externos foram preenchidos com PBS.

Nove grupos de 8 réplicas cada foram testados:

1. Somente meio (EBM-2 suplementado com Hepes 10 mM e soro de camundongo normal 2% (I).

2. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO (controle de diluente para deltonina) (H).

3. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 10 nM (G).

4. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 30 nM (F).

5. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 100 nM (E).

6. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 300 nM (D).

7. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 1 μ M (C).

8. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 3 μ M (B).

9. Meio mais 1 μ l/ml de DMSO, deltonina 10 μ M (A).

Os explantes foram então cultivados a 37°C/CO₂ 5% em uma incubadora úmida por 6 dias. Os explantes foram fixados em temperatura ambiente por 20 minutos por adição de um volume igual (0,3 ml) de paraformaldeído 4% em PBS a cada poço. Após lavagem três vezes com solução salina tamponada com Hepes (HBS, NaCl 150 mM, Hepes 10 mM), os explantes foram corados com 10 μ g/ml de conjugado de FITC-BS-1 lectina (BS-1 lectina se liga especificamente às células endoteliais de camundongo) em HBS de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte, os explantes foram lavados três vezes com HBS. Os crescimentos de vasos a partir dos explantes foram visualizados por microscopia por fluorescência e foram tiradas fotografias para análise de dados. Foram

fotografadas várias imagens fluorescentes em múltiplas profundidades para cada explante, e as fotografias foram processadas usando o software de desconvolução de tal forma que pudessem ser determinados os crescimentos de vasos totais para cada explante. O crescimento celular total associado a cada explante também foi visualizado por microscopia óptica com o uso de um microscópio de dissecção, e documentado por fotografia. Para facilitar a visualização e a análise, foi preparada uma imagem composta invertida em preto e branco a partir de várias imagens fluorescentes dos crescimentos de vasos para cada explante. O número de brotos de vasos e o número de ramificações de vasos para cada explante foram então contados, com a pessoa responsável pela contagem desconhecendo a identidade de cada amostra. Os resultados estão resumidos na Tabela 4, e são mostrados graficamente na Figura 1.

Tabela 4

Concentração de deltonina (μM)	Brotos		Ramificações	
	Média	DP	Média	DP
Sem DMSO	28	10	43	17
0	17	5	26	9
0,01	11	7	16	10
0,03	18	6	26	9
0,1	18	6	24	9
0,3	16	4	20	5
1	13	5	16	7
3	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Observação: brotos e ramificações de vasos em explantes cultivados com deltonina 0,01 μM não são estatisticamente diferentes de culturas de explante de controle tratadas com DMSO, apesar de uma aparente redução no gráfico.

Houve um efeito inibidor significativo isolado de DMSO, o veículo para deltonina, na resposta angiogênica, como pode ser observado por reduções significativas do brotamento e ramificação de vasos em explantes aórticos tratados com DMSO, em comparação com explantes aórticos cultivados na ausência de DMSO.

No entanto, concentrações elevadas de deltonina inibiram significativamente os brotos de vasos (a 10 e 3 μM) e as ramificações de vasos (a 10, 3 e 1 μM) de explantes aórticos, em comparação com culturas de explante de controle tratados DMSO.

Exemplos representativos das amostras são mostrados nas Figuras 2 e 3.

Exemplo 3

Determinação da inibição da proliferação e migração das células endoteliais por saponinas esteroidais com a utilização do método de ensaio AngioSponge™

O ensaio AngioSponge™ permite a liberação lenta de fator de crescimento capturado em agarose, o que estimula a proliferação e migração das células endoteliais e fornece uma matriz semelhante a um tecido para neovascularização. Portanto, o ensaio pode ser usado para avaliar a eficácia de tratamentos projetados para inibir a angiogênese, determinada por contagem de vasos sangüíneos após coloração imunoistoquímica de CD31 de células endoteliais (McCarty e

cols., *International Journal of Oncology*, 21:5-10, 2002).

Gelfoams (Pharmacia & Upjohn) foram cortados em pedaços de aproximadamente 7 x 7 x 7 mm sob condições estéreis, e pré-embebidos de um dia para o outro com
5 solução salina tamponada com fosfato estéril. Os gelfoams hidratados foram então parcialmente secos. O fator de crescimento (bFGF) foi diluído até uma concentração inicial de 2 µg/ml em agarose 0,4% aquecida (37°C). Os gelfoams parcialmente secos foram colocados na solução de fator de
10 crescimento, ou em agarose 0,4% aquecida sem fator de crescimento, e depois transferidos para uma placa de Petri contendo agarose 0,4% aquecida (diluição de 1:1, concentração final de fator de crescimento de 1 µg/ml) para polimerização e solidificação.

15 Setenta fêmeas de camundongos C3H/HeJ receberam um microchip, foram pesadas e randomizadas com base no peso corporal em 7 grupos com 10 camundongos por grupo. Para implantação, os camundongos foram anestesiados por inalação de halotano. Um pequeno canal foi criado por uma agulha do
20 tipo trocar entre a 3ª e 4ª glândula mamária, e a esponja foi inserida na profundidade total do canal e a incisão fechada com um grampo cirúrgico.

Os compostos foram formulados em N-metilpirrolidona (NMP):PEG300:água (1:9:10, v/v). A dosagem foi estabelecida
25 com base nos dados de IC₅₀ *in vitro* e em estudos preliminares de toxicidade. Os compostos foram administrados diariamente por injeção intraperitoneal, em um volume de dosagem de 10 ml/kg, uma vez ao dia pelo período de estudo como mostrado na Tabela 5.

Tratamento	Dosagem de uma vez ao dia
Veículo	NMP:PEG300:água (1:9:10, v/v)
Veículo + bFGF	NMP:PEG300:água (1:9:10, v/v)
Dioscina + bFGF	10 mg/kg
Deltonina + bFGF	10 mg/kg
Trilina + bFGF	60 mg/kg
Prosapogenina A + bFGF	20 mg/kg
Sorafenib + bFGF	60 mg/kg

O tratamento era iniciado quando todos os animais tinham se recuperado totalmente da anestesia, e continuava por 10 dias. No 11º Dia, as angio-esponjas foram retiradas e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido com OCT para coloração de CD31 nos cortes congelados.

CD31/PECAM-1 é um antígeno presente especificamente em células endoteliais, e pode, portanto, ser usado como um marcador para vasos sangüíneos. Amostras congeladas da esponja foram crio-seccionadas (12 µm), montadas em lâminas Plus carregadas positivamente (Fisher Scientific), e secas ao ar por 30 minutos. Os cortes congelados, por sua vez, foram fixados em acetona gelada, acetona/clorofórmio (1:1, v/v) e acetona por 5 minutos cada, e depois lavados com PBS (solução salina com tampão fosfato). Após bloqueio com soro de cavalo normal contendo 5% PBS e soro de cabra normal 1%, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal CD31 PECAM-1 anticamundongo de rato (1:5.000 em solução de bloqueio, PharMingen, San Diego, CA) por 4 horas em temperatura ambiente. As laminas foram então lavadas três vezes com PBS, e incubadas com anticorpo secundário anti-

rato adequado. As reações positivas foram visualizadas por incubação das lâminas em 3,3'-diaminobenzidina estável por 5-10 minutos. Os cortes foram enxaguados com água destilada, contracorados com hematoxilina de Gill por 1 minuto, e montados com Universal Mount (Research Genetics). Amostras de controle expostas somente ao anticorpo secundário não mostraram coloração específica. Placenta de camundongo foi usada como controle positivo. Para quantificação, foram escolhidos 3 campos visuais independentes e foram contados os spots ou vasos com lúmen que coraram positivos.

Os resultados foram tabulados como número médio de vasos sangüíneos (contagens de CD31), e estão resumidos na Tabela 6:

15

Tabela 6

Tratamento	Número médio de vasos sangüíneos	Percentual de indução
Veículo	0	0
Veículo + bFGF	72	100
Dioscina + bFGF	35	49
Deltonina + bFGF	44	61
Trilina + bFGF	41	57
Prosapogenina A + bFGF	21	29
Sorafenib + bFGF	2	3

O percentual de indução para um tratamento é a diferença em contagens de CD31 entre o tratamento (+bFGF) e o veículo isoladamente (no bFGF), dividido pela diferença entre as contagens de CD31 entre o veículo com bFGF e o

veículo isoladamente (sem bFGF), expresso como uma percentagem.

O número de vasos sangüíneos e o percentual de indução são tabulados graficamente contra tratamentos nas Figuras 4 e 5. Os resultados demonstram que saponinas esteroidais causam uma redução da angiogênese no sistema de modelo de angio-esponja.

Exemplo 3

Determinação da inibição da proliferação e migração das células endoteliais por saponinas esteroidais com a utilização do método de ensaio de AngioChamber™

O ensaio de AngioChamber™ utiliza o processo fisiológico normal de cicatrização de feridas, que promove a formação de uma cápsula fibrosa em torno de uma câmara implantada (Wood e cols., (2000) *Cancer Research*, 60(8): 2.178-89). A inclusão de bFGF na câmara induz o desenvolvimento de vasos sangüíneos na cápsula fibrosa. Portanto, o ensaio avalia a eficácia de tratamentos por medida de seu efeito tanto sobre a formação da cápsula fibrosa, medida pelo peso líquido da cápsula no término do estudo, quanto pela determinação do suprimento de vasos sangüíneos à câmara, por quantificação do teor de hemoglobina. O teor de hemoglobina da cápsula fibrosa é uma medida da neovascularização, que é avaliada pelo ensaio de Drabkin.

As angiocâmaras eram câmaras de tecido poroso feito de perfluor-alcóxi-Teflon, e preenchidas com ágar 0,8% contendo 20 UI/ml de heparina, com ou sem 1 µg/ml de bFGF humano. Ambas as extremidades da câmara foram lacradas com tampas removíveis do mesmo material. As câmaras foram

preenchidas sob condições estéreis com 20 UI/ml de heparina contendo 0,8% de ágar, com ou sem 1 µg/ml de bFGF humano. A solução de agarose foi mantida a 37°C, antes do preenchimento das câmaras.

5 Setenta fêmeas de camundongos FvB receberam um microchip, foram pesadas e randomizadas com base no peso corporal em 7 grupos com 10 camundongos por grupo. Para
10 implantação, os camundongos foram anestesiados por inalação de halotano. Aproximadamente 150 µl de ar filtrado estéril foram injetados nas costas de cada camundongo, entre as omoplatas, resultando em uma bolsa de ar na qual foi feita uma pequena incisão e a câmara foi inserida. A ferida foi fechada com dois grampos cirúrgicos de 1,4 mm.

Os tratamentos, que foram todos formulados em
15 NMP:PEG300:água (1:9:10, v/v) e administrados diariamente por injeção intraperitoneal, foram como apresentados na Tabela 7:

Tabela 7

Tratamento	Dosagem de uma vez ao dia
Veículo	NMP:PEG300:água (1:9:10, v/v)
Veículo + bFGF	NMP:PEG300:água (1:9:10, v/v)
Dioscina + bFGF	10 mg/kg
Deltonina + bFGF	10 mg/kg
Trilina + bFGF	60 mg/kg
Prosapogenina A + bFGF	20 mg/kg
Sorafenib + bFGF	60 mg/kg

O tratamento era iniciado quando todos os animais
20 tinham se recuperado totalmente da anestesia, e continuou

por 5 dias. No 6° Dia, as câmaras fibrosas vascularizadas foram removidas e o peso líquido foi registrado para cada implante. A câmara de cada camundongo foi então congelada rapidamente com nitrogênio líquido, e armazenada a -20°C
5 até avaliada quanto ao teor de hemoglobina.

As amostras da cápsula fibrosa foram descongeladas e mantidas no gelo durante o procedimento. Foi adicionada água estéril a cada amostra descongelada, e a amostra foi homogeneizada com um UltraTourax em alta velocidade. Para
10 evitar a contaminação cruzada, o UltraTourax era enxaguado por 30 segundos com 5 ml de água destilada após a homogeneização de cada amostra. O homogeneizado foi transferido para tubos de Eppendorf de 2 ml e armazenado no gelo. Os tubos de Eppendorf foram centrifugados a 4°C e em
15 alta velocidade (14.000 forças centrífugas relativas (RCF)) por 60 minutos. Foi então transferido 1,0-1,5 ml da solução aquosa intermediária (homogeneizado), entre o pélete e a camada de gordura para tubos de Eppendorf de 1,5 ml recém rotulados, e armazenados no gelo. Cinquenta µl de cada
20 homogeneizado foram transferidos em poços separados de uma placa de 96 poços. Cinquenta µl de água foram transferidos para 2 poços como controles em branco. Cinquenta µl de reagente de Drabkin foram então adicionados a cada poço, e misturados. Após incubação de 15 minutos em temperatura
25 ambiente, foi medida a absorbância de cada amostra a 540 nm, e o volume de sangue para cada amostra calculado a partir de uma curva padrão.

Os resultados foram tabulados como peso médio da câmara, teor médio de sangue (a partir do teor de
30 hemoglobina) e indução percentual, e estão resumidos na

Tabela 8:

Tabela 8

Tratamento	Peso médio da câmara (g)	Teor médio de sangue (µl)	Indução percentual
Veículo	0,066	0,44	0
Veículo + bFGF	0,375	2,21	100
Dioscina + bFGF	0,131	1,24	45
Deltonina + bFGF	0,126	0,79	20
Trilina + bFGF	0,421	1,46	58
Prosapogenina A + bFGF	0,389	1,92	84
Sorafenib + bFGF	0,322	0,92	27

A inibição percentual para um tratamento é a diferença no teor de sangue entre o tratamento (+bFGF) e o veículo isoladamente (sem bFGF), dividida pela diferença no teor de sangue entre o veículo com bFGF e o veículo isoladamente (sem bFGF), expressa como uma percentagem.

O teor médio de sangue das angiocâmaras e o percentual de indução são tabulados graficamente contra tratamentos nas Figuras 6 e 7. Os resultados demonstram que saponinas esteroidais causam uma redução da angiogênese no sistema de modelo de angio-esponjas.

Finalmente, será observado que várias modificações e variações dos métodos e das composições da invenção aqui descritos ficarão evidentes para aqueles na técnica, sem se

afastar do escopo e do espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas, deve-se entender que a invenção, como reivindicada, não deve ser indevidamente limitada por essas

5 modalidades específicas. Na verdade, deseja-se que várias modificações dos modos descritos para a prática da invenção que são evidentes para aqueles com habilidade na técnica sejam incluídas no escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma saponina esteroidal, caracterizada por ser usada na preparação de um medicamento para a inibição da angiogênese em um sistema biológico.

5 2. Uso de uma saponina esteroidal, caracterizada por ser usada na preparação de um medicamento para a inibição da angiogênese por proliferação e/ou migração de células endoteliais em um sistema biológico.

10 3. Uso de uma saponina esteroidal, caracterizado por ser usada na preparação de um medicamento para redução da quantidade de um agente antiangiogênico requerida para ser administrada a um sistema biológico para obter um nível desejado de inibição da angiogênese.

15 4. Uso de uma saponina esteroidal, caracterizado por ser usada na preparação de um medicamento para redução da quantidade de um agente antiangiogênico requerida para ser administrada a um sistema biológico para obter um nível desejado de inibição da proliferação e/ou migração de células endoteliais.

20 5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a saponina esteroidal inclui um sacarídeo anexado a uma única posição do componente de sapogenina da saponina esteroidal.

25 6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo está anexado à posição C-3 da sapogenina.

30 7. Uso, de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo inclui uma ou mais unidades monossacarídicas selecionadas de D-glicose (Glc), L-ramnose (Rha), D-galactose (Gal), ácido D-

glicurônico (GlcA), D-xilose (Xyl), L-arabinose (Ara), D-fucose (Fuc), ácido D-galacturônico (GalA).

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o componente de sapogenina da saponina esteroidal é baseado em uma sapogenina selecionada do grupo que consiste em um espirostanol, incluindo diosgenina, iamogenina (neodiosgenina), iucagenina, sarsasapogenina, tigogenina, smilagenina, hecogenina, gitogenina, convalamarogenina, neoruscogenina e solagenina; um furostanol, incluindo protodiosgenina, pseudo-protodiosgenina, metil protodiosgenina, protoiamogenina e metil protoiamogenina.

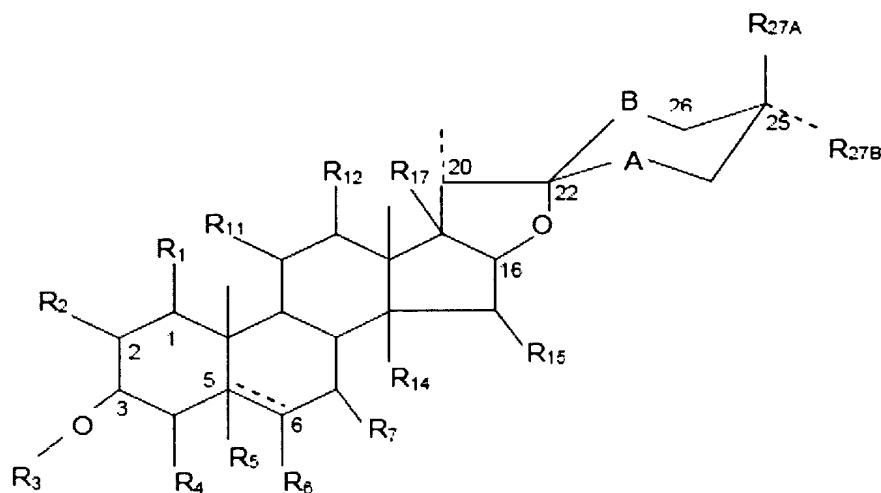
9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a saponina esteroidal é uma chacotriosídeo-saponina esteroidal ou uma solatriosídeo-saponina esteroidal.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a chacotriosídeo-saponina esteroidal é selecionada do grupo que consiste em diosgenina ligada por meio da posição C-3 a chacotriose; diosgenina ligada por meio da posição C-3 a outro chacotriosídeo; tigogenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo; sarsasapogenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo; smilagenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo; iucagenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo; e iamogenina ligada por meio da posição C-3 a um chacotriosídeo, e em que a solatriosídeo-saponina esteroidal é selecionada do grupo que consiste em gracilina; deltonina; diosgenina solatriose; diosgenina ligada por meio da posição C-3 a

outro solatriosídeo; tigogenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; sarsasapogenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; smilagenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; iucagenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo; e iamogenina ligada por meio da posição C-3 a um solatriosídeo.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a saponina esteroidal:

(i) possui a fórmula química:



em que:

R_1 , R_2 , R_4 , R_6 , R_7 , R_{11} , R_{12} , R_{14} , R_{15} e R_{17} são independentemente H, OH, =O, grupos éster farmacologicamente aceitáveis ou grupos éter farmacologicamente aceitáveis;

R_5 é H quando C-5,C-6 é uma ligação simples, e nada quando C-5,C-6 é uma ligação dupla;

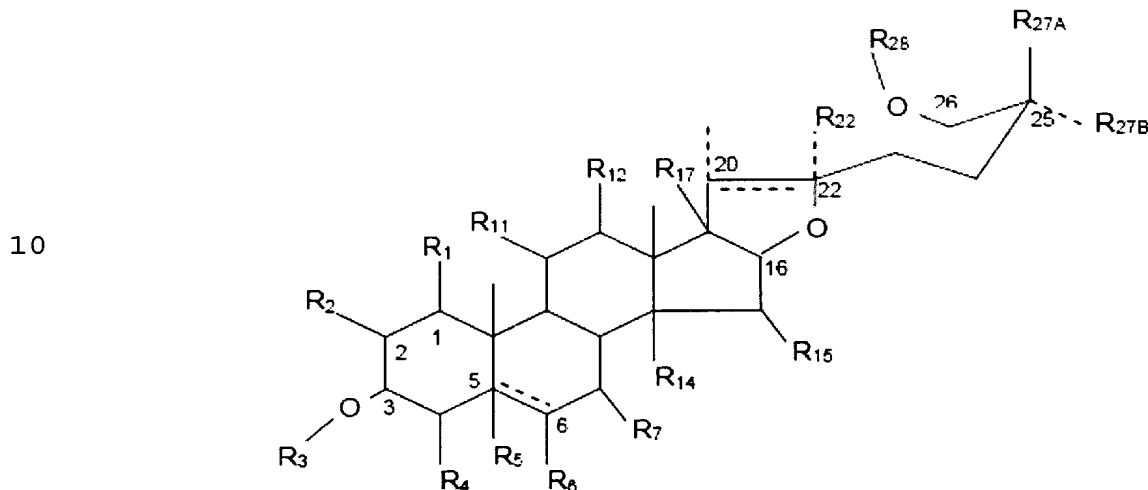
A é O concomitantemente com B sendo CH_2 , ou B é O concomitantemente com A sendo CH_2 ;

R_{27A} é H concomitantemente com R_{27B} sendo CH_3 , ou R_{27A} é

CH₃ concomitantemente com R_{27B} sendo H;

R₃ compreende um grupo glicosil ligado por meio do átomo de oxigênio à sapogenina esteroidal em C-3; ou um sal farmaceuticamente aceitável, ou derivado deste.

5 (ii) possui a fórmula química:



15 em que:

R₁, R₂, R₄, R₆, R₇, R₁₁, R₁₂, R₁₄, R₁₅ e R₁₇ são independentemente H, OH, =O, grupos éster farmacologicamente aceitáveis ou grupos éter farmacologicamente aceitáveis;

20 R₅ é H quando C-5, C-6 é uma ligação simples, e nada quando C-5, C-6 é uma ligação dupla;

R₂₂ é um grupo hidroxil ou um grupo alcoxil quando C-20, C-22 é uma ligação simples, ou nada quando C-20, C-22 é uma ligação dupla;

25 R_{27A} é H concomitantemente com R_{27B} sendo CH₃, ou R_{27A} é CH₃ concomitantemente com R_{27B} sendo H;

R₂₈ é H ou um sacarídeo; ou um sal farmaceuticamente aceitável, ou derivado deste;

30 R₃ compreende um grupo glicosil ligado por meio do átomo de oxigênio à sapogenina esteroidal em C-3; ou um sal

farmaceuticamente aceitável, ou derivado deste.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a saponina esteroidal é selecionada a partir do grupo consistindo em 5 diosgenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo, tigogenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo, sarsasapogenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo, smilagenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo, iucagenina ligada por meio da posição C-3 a um 10 sacarídeo, e iamogenina ligada por meio da posição C-3 a um sacarídeo.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a saponina esteroidal é selecionada do grupo que consiste em deltonina 15 (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc), pró-sapogenina A (diosgenina Rha2, Glc) e asperina (diosgenina [Rha 4, Rha 4], Rha 2, Glc).

14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, caracterizado 20 pelo fato de que ainda inclui a administração de um agente antiangiogênico ao sistema biológico.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o agente antiangiogênico é um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em um 25 anticorpo anti-VEGF, incluindo um anticorpo humanizado e/ou quimérico, um aptâmero de anti-VEGF, um oligonucleotídeo VEGF anti-senso, angiostatina, endostatina, um interferon, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinóico e um inibidor tecidual de metaloproteinase-2 e -9.

30 16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15,
caracterizado pelo fato de que a angiogênese no sistema
biológico é angiogênese associada à formação ou expansão de
tumores sólidos, angiofibroma, neovascularização corneana,
5 neovascularização retiniana/coroidiana, retinopatia
diabética, degeneração macular relacionada à idade,
malformações arteriovenosas, artrite, artrite reumatóide,
osteoartrite, artrite psoriática, lúpus, distúrbios do
tecido conjuntivo, síndrome de Osler-Weber, placas
10 ateroscleróticas, psoríase, granuloma piogênico,
fibroplasias retrolentais, esclerodermia, granulações,
hemangioma; tracoma, articulações hemofílicas, adesões
vasculares, cicatrizes hipertróficas, doenças ou condições
associadas à inflamação aguda ou crônica, doenças ou
15 condições associadas à inflamação crônica do pulmão,
incluindo asma, sarcoidose, doenças inflamatórias do
intestino, doença de Crohn ou colite ulcerativa.

17. Composição, caracterizada por incluir uma saponina
esteroidal e um agente antiangiogênico.

20 18. Composição, caracterizada por ser usada para
inibir a proliferação e/ou migração de células endoteliais
em um sistema biológico, a composição incluindo uma
quantidade eficaz de uma saponina esteroideal.

19. Produto de combinação, caracterizado por incluir:

- 25 - uma saponina esteroideal; e
- um agente antiangiogênico;

a saponina esteroideal e o agente antiangiogênico
fornecidos em uma forma para co-administração a um
indivíduo ou em uma forma para administração separada a um
30 indivíduo.

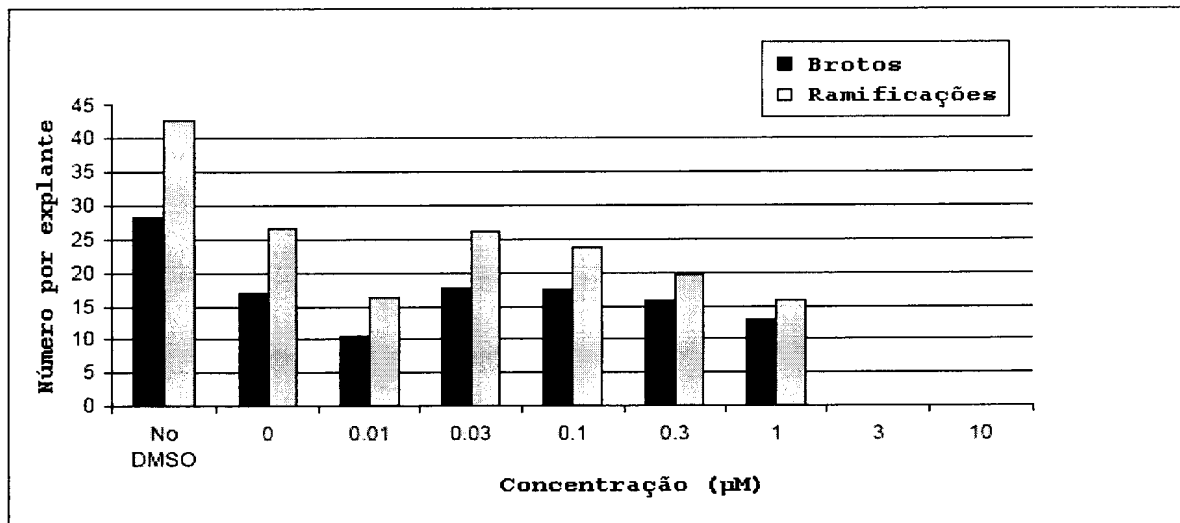
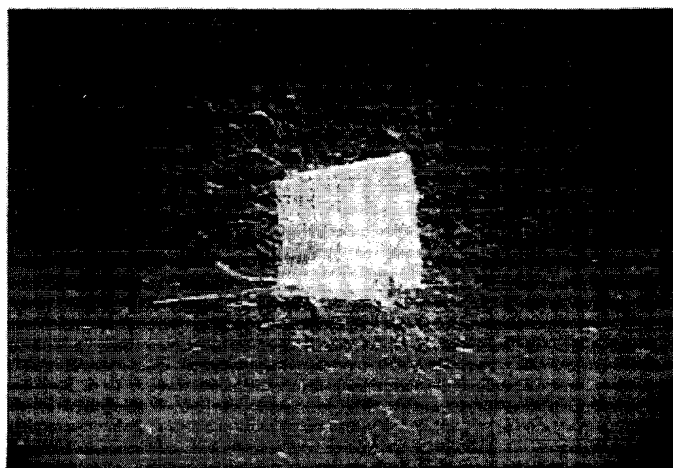
Fig. 1

Fig. 2

Controle de DMSO -
microscopia óptica



Controle de DMSO -
corada com Fitc-BS-a
lectina

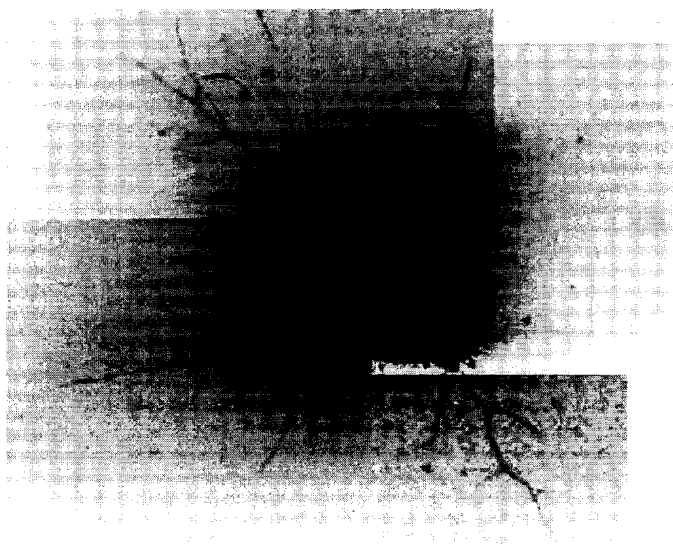
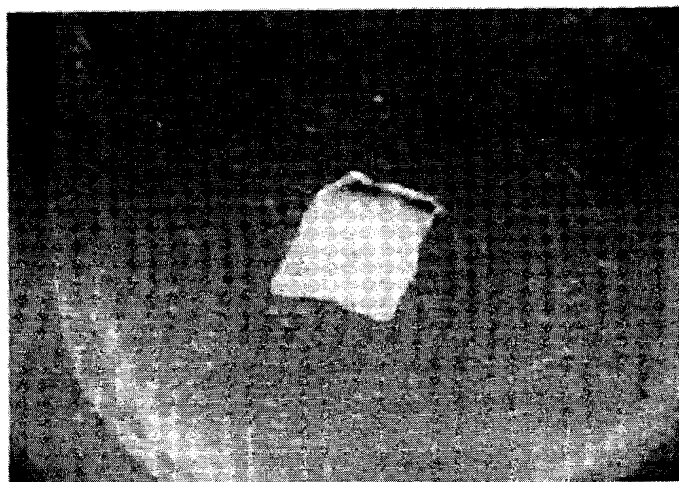


Fig. 3

Deltonina 10 μ M -
microscopia óptica



Deltonina 10 μ M -
corada com BS-1
lectina

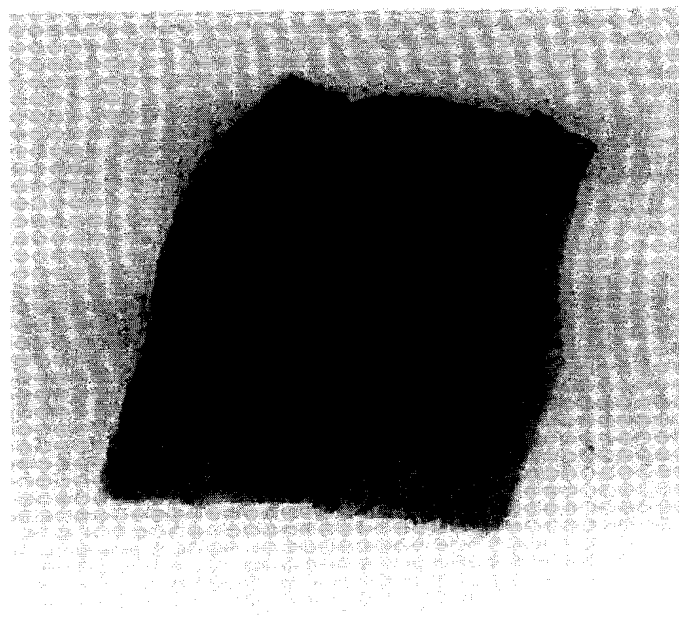


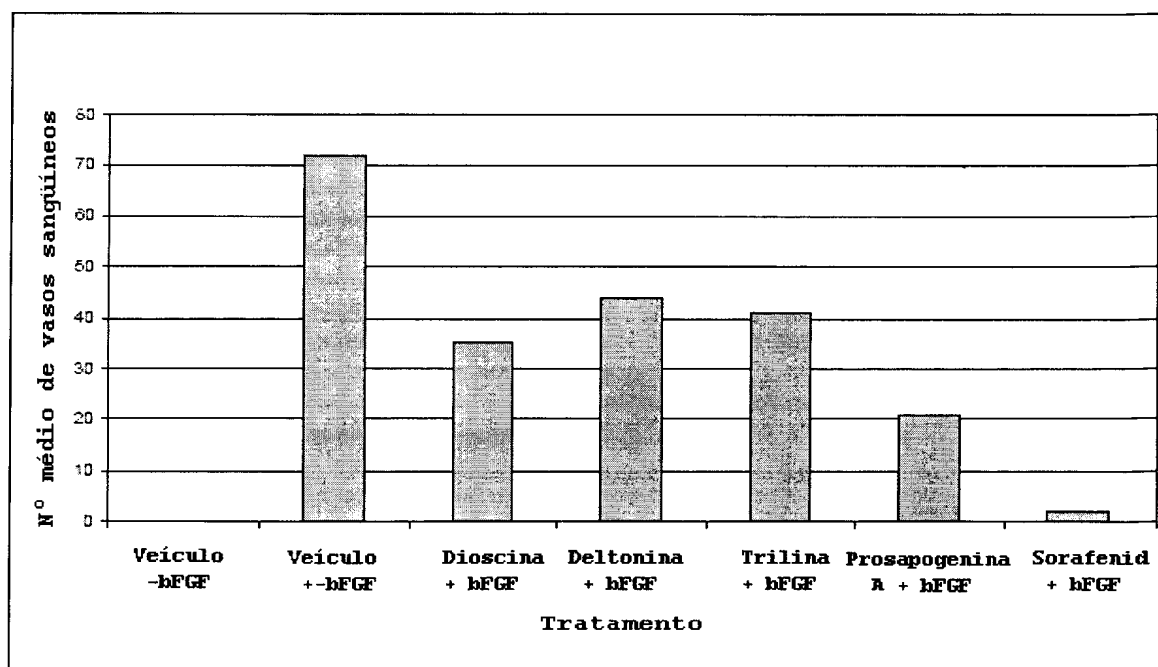
Fig. 4

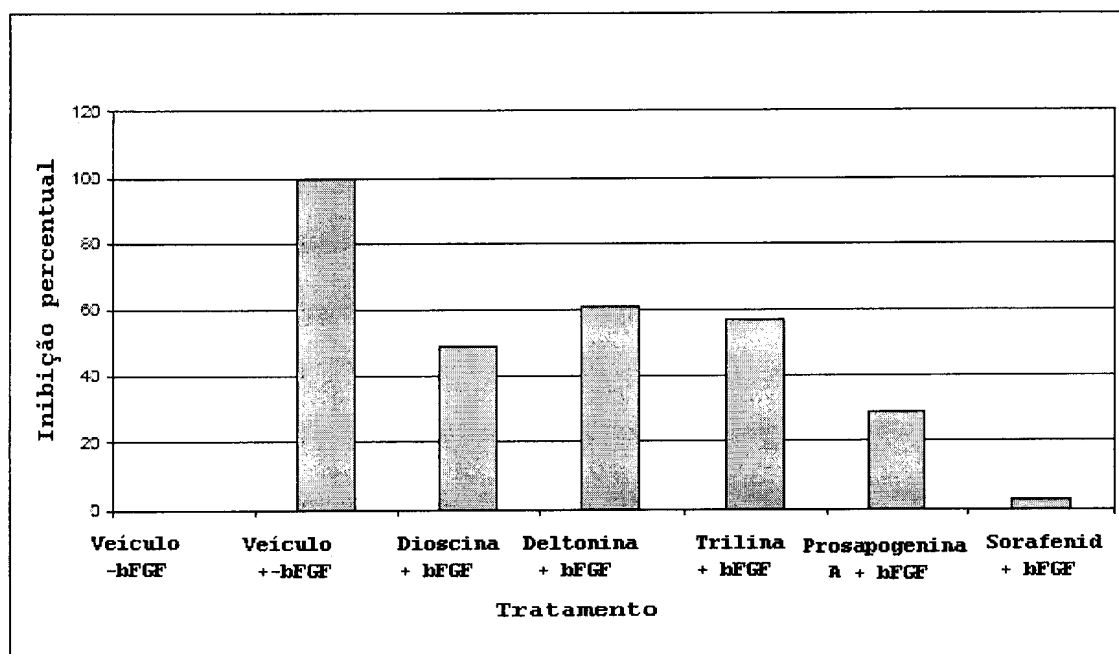
Fig. 5

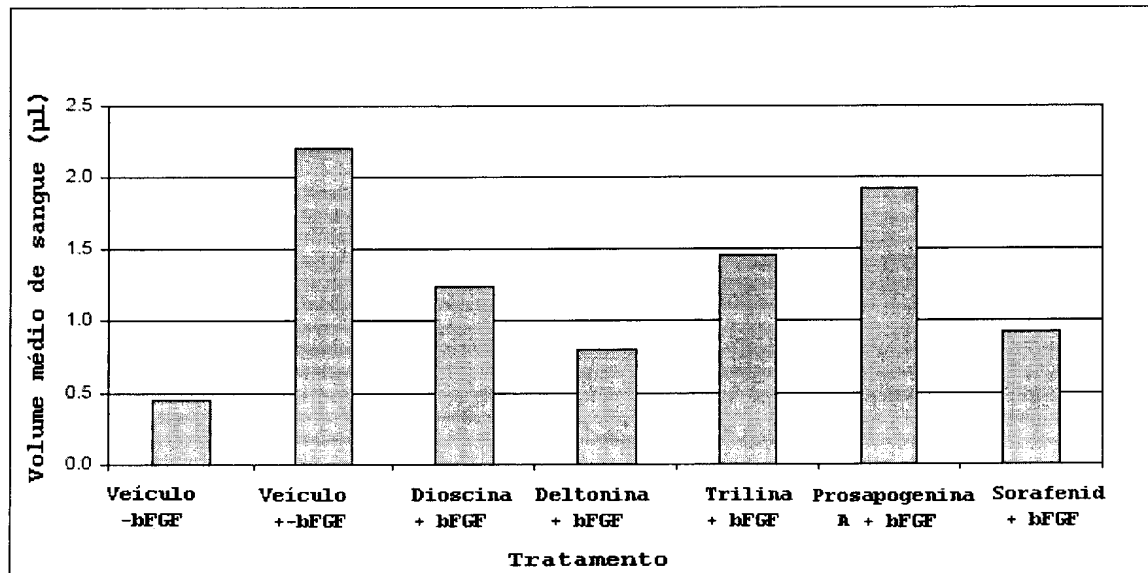
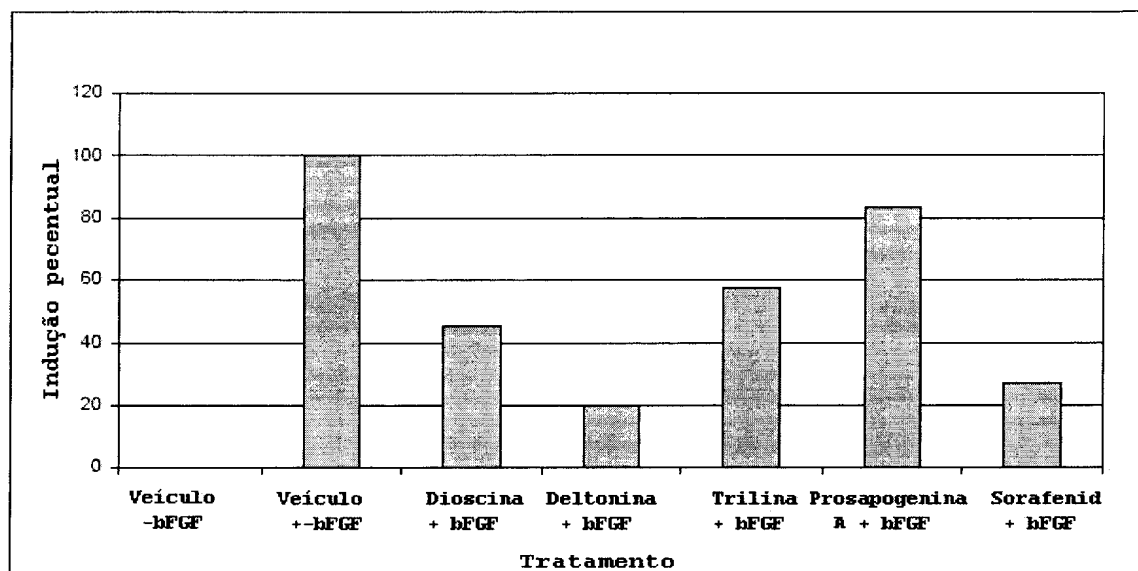
Fig. 6

Fig. 7

RESUMO

MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE

A presente invenção está relacionada a um método de inibição de angiogênese em um sistema biológico. O método
5 inclui a administração ao sistema biológico de uma quantidade eficaz de uma saponina esteroideal.