

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.06.25**

(30) Prioridade(s): **2002.06.25 JP 2002185296**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.06.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.13**
198/2008

(73) Titular(es):

HAMAMATSU PHOTONICS K.K.

1126-1, ICHINO-CHO, HAMAMATSU-SHI

SHIZUOKA-KEN 435-8558

JP

(72) Inventor(es):

SUSUMU NAKAJIMA

ISAO SAKATA

YOSHINORI NAKAE

JP

JP

JP

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA

R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

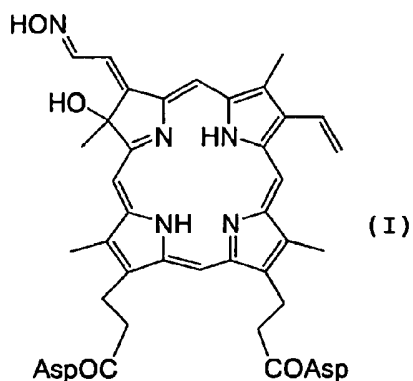
PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO FOTODINÂMICO PARA DOENÇAS VASCULARES**

(57) Resumo:

RESUMO**"Método de diagnóstico fotodinâmico para doenças vasculares"**

Vários diagnósticos com a aplicação de diagnóstico/terapia fotodinâmica (terapia fotodinâmica: TFD) em que é utilizada a absorção altamente selectiva de um derivado de ácido iminocloroaspártico ou o seu sal farmacologicamente aceitável em neovasos e a sua absorção selectiva em células cancerosas. Mais especificamente, remédios para o reumatismo, remédios para a queratose inflamatória, agentes para confirmação da localização de um nódulo linfático sentinela e diagnóstico para metástases de cancro que contêm como ingrediente activo um derivado de ácido iminocloroaspártico representado pela fórmula (I) seguinte ou o seu sal farmacologicamente aceitável:



em que Asp representa aspartato.

DESCRIÇÃO

"Método de diagnóstico fotodinâmico para doenças vasculares"

Campo técnico

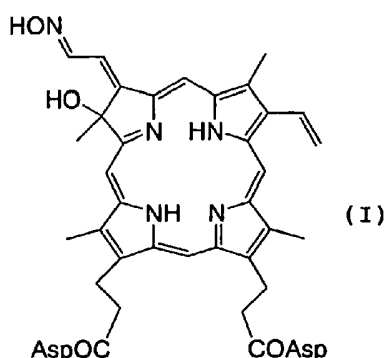
A presente invenção refere-se a agentes terapêuticos destinados a utilização em terapia fotodinâmica (TFD) de queratose inflamatória e contendo como um ingrediente activo um derivado de ácido aspártico iminoclorado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

Arte anterior

As terapias fotodinâmicas emergiram como uma nova forma para o tratamento dos cancros. Na TFD, um certo derivado de porfirina é injectado por via intravenosa e é deixado acumular preferencialmente em tecidos cancerosos (tumor). A luz laser é então irradiada para destruir selectivamente os tecidos cancerosos. A técnica explora duas propriedades únicas dos derivados de porfirina: a sua capacidade para se acumularem selectivamente em tecidos cancerosos e a sua capacidade fotossensibilizadora.

Os presentes inventores desenvolveram estudos extensivos para desenvolver derivados de porfirina potentes para utilização em TFD e propuseram até agora vários derivados de porfirina de um só componente que são rapidamente eliminados a partir de tecidos normais e exibem uma fototoxicidade reduzida, retendo simultaneamente a capacidade para se acumularem de forma selectiva e estável em tecidos cancerosos.

Um exemplo é um derivado particular de ácido aspártico iminoclorado, um derivado de porfirina que é adequado para utilização com laser de titânio safira (comprimentos de onda de 600 nm ou menos e 670 ou mais) ou díodo laser (670 nm) e tem a estrutura apresentada pela fórmula seguinte (I):



em que Asp representa um resíduo de ácido aspártico.

De entre o derivado de ácido aspártico iminoclorado representado pela fórmula (I) e os seus sais farmacologicamente aceitáveis, um sal de sódio designado por ATX-S10·Na, revela uma selectividade particularmente elevada para tecidos cancerosos e neovascularizações. O composto provou ser altamente eficaz como agente de TFD para o tratamento de tumores e degeneração macular relacionada com a idade e foi já apresentado um pedido de patente que reivindica este aspecto do composto (WO 98/14453).

Várias doenças são acompanhadas por angiogénese, incluindo a artrite reumatóide e a queratose inflamatória.

A artrite reumatóide é uma doença do colagénio caracterizada por inflamação vascular e especula-se que seja provocada por respostas imunes anormais. No entanto, as causas exactas da doença são ainda desconhecidas e terão ainda que ser estabelecidos tratamentos eficazes. Os tratamentos actuais para a artrite reumatóide incluem tratamentos com drogas, tais como agentes anti-inflamatórios, esteróides e agentes anti-reumático, assim como tratamentos cirúrgicos, tais como a substituição artificial de articulações. No entanto, nenhum destes é suficientemente eficaz para curar a doença. Trauner *et al.* examinaram a possibilidade de TFD no tratamento da artrite reumatóide e foi já concedida uma patente aos mesmos inventores (Patente US N.º 5368841). No entanto, os fotossensibilizadores revelados nesta patente podem exibir fototoxicidade uma vez que os compostos não são suficientemente selectivos para se acumularem num tecido particular mas permanecem no organismo durante um período de tempo prolongado.

A queratose inflamatória, por outro lado, é uma doença da pele na qual a "inflamação", uma condição causada quando vasos sanguíneos da epiderme se expandem para permitir que linfócitos e outros leucócitos se infiltrem na pele, ocorre em conjunção com "queratose", um espessamento da epiderme e do estrato córneo. Os tratamentos para a doença incluem agentes anti-inflamatórios, tais como esteróides, inibidores do crescimento da epiderme tais como retinóides e tratamentos por UV (e.g. PUVA), mas nenhum oferece uma cura decisiva.

Em *Trends Biotechnol.*, vol. 13(1), 1995, pp. 14-18 é revelado que a psoríase pode ser tratada por TFD.

Recentemente, a TFD utilizando cloridrato de ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) surgiu como um tratamento eficaz. Um precursor para a biossíntese de protoporfirina IX, 5-ALA é conhecido por exibir algumas das propriedades químicas da protoporfirina IX: não se acumula prontamente em neovascularizações e pode apenas absorver luz a comprimentos de onda de no máximo 630 nm. Estas propriedades limitam os efeitos terapêuticos do tratamento com 5-ALA.

Entretanto, os presentes inventores dirigiram a atenção para a capacidade do derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) e dos seus sais farmaceuticamente aceitáveis para se acumularem selectivamente em neovascularizações e conduziram pesquisas extensivas para examinar a possibilidade destes compostos como potenciais agentes terapêuticos de TFD. Estes esforços conduziram eventualmente à verificação de que não apenas quando utilizado em condições de doença tais como cancro e perturbações oftalmológicas, mas também noutras condições de doença, o ATX-S10·Na, um sal de sódio do composto, exhibe uma capacidade superior para se acumular em células inflamatórias responsáveis pela angiogénese. Os presentes inventores verificaram também que quando utilizado em TFD, o ATX-S10·Na pode servir como cura altamente eficaz para várias perturbações de pele, tais como queratose inflamatória (dermatites tais como psoríase).

De entre o derivado de ácido aspártico iminoclorado representado pela fórmula (I) e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, o ATX-S-10·Na, um sal de sódio,

é conhecido por emitir luz fluorescente vermelha a 670 nm quando irradiado com luz com um comprimento de onda de excitação adequado (e.g. 400 nm) e pode assim ser utilizado para proporcionar um diagnóstico definitivo da localização de um tumor. Estes são factos já revelados.

Em operações cirúrgicas para a remoção de tumores, a determinação exacta da localização do tumor ajuda a evitar a remoção desnecessária de tecidos normais e melhora a QdV dos pacientes por redução do seu incómodo.

A cirurgia do cancro é frequentemente combinada com quimioterapia para reduzir o risco de metástases. No entanto, a quimioterapia é usualmente acompanhada por efeitos secundários e é preferivelmente evitada, se possível.

Para determinar a presença de metástases, a biópsia de nódulos linfáticos sentinela foi recentemente implementada. Os nódulos linfáticos sentinela (que podem ser referidos como "NS" daqui em diante) são os primeiros nódulos linfáticos a receber drenagem de um cancro. Se os resultados de uma biópsia de um NS não indicarem a presença de metástases, a remoção dos nódulos linfáticos circundantes pode ser evitada e assim o risco de complicações tais como actividade imune diminuída podem ser reduzidos, assim como o pode ser a probabilidade de quimioterapia pós-operatória.

As técnicas de coloração com corantes e as técnicas com radioisótopos são actualmente utilizadas para determinar a localização do NS. No entanto, os tecidos gordos do organismo e os vasos linfáticos delgados tornam difícil realizar estas técnicas sem uma perícia significativa e consequentemente a determinação da localização exacta do NS.

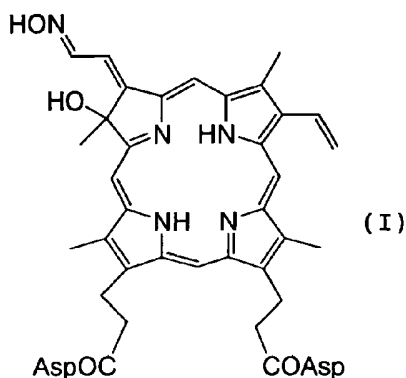
Intrigados com a capacidade do derivado de ácido aspártico iminoclorado e dos seus sais farmacêuticamente aceitáveis para emitir fluorescência, os presentes inventores realizaram um esforço para desenvolver um agente de diagnóstico que possibilite a determinação da localização do NS e o diagnóstico da presença de metástases de cancros. Os presentes inventores verificaram mais tarde que estes compostos podem servir como agentes de diagnóstico altamente

eficazes para a localização do NS e para o diagnóstico da presença de metástases de cancro.

Assim, constitui um objectivo da presente invenção proporcionar um agente terapêutico para utilização numa terapia fotodinâmica (TFD) de queratose inflamatória.

Divulgação da invenção

Um aspecto essencial da presente invenção refere-se a um agente terapêutico para utilização numa teoria fotodinâmica (TFD) de queratose inflamatória. Este agente contém como ingrediente activo um ácido aspártico iminoclorado representado pela fórmula (I) seguinte ou um seu sal farmacologicamente aceitável:



em que Asp representa um resíduo de ácido aspártico.

Especificamente, o aspecto essencial da presente invenção é característico no facto da capacidade do derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou de um seu sal farmacologicamente aceitável, para se acumular em neovascularizações ou células de tumor, ser explorada na realização da TFD.

Um exemplo de doenças causadas pela angiogénese é a queratose inflamatória. A queratose inflamatória é uma doença da pele caracterizada por ruborização e queratinização, um sintoma notável de inflamação. A doença inclui psoríase e parapsoríase, cujo tratamento requer agentes fortes tais como esteróides. O derivado de ácido aspártico iminoclorado de

fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável pode, no entanto, acumular-se eficazmente em células inflamatórias subepidérmicas quando administrado percutaneamente e por exposição das células a irradiação com laser para realização da TFD a doença pode ser tratada eficazmente.

Assim, a presente invenção refere-se a um medicamento para tratar eficazmente a queratose inflamatória. O medicamento compreende o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável para utilização em TFD para indução da necrose de células inflamatórias subepidérmicas. Esta concretização refere-se também a um agente terapêutico para utilização em TFD da queratose inflamatória (doenças de pele tais como psoríase) contendo como ingrediente activo o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

A presente invenção revelou que de entre o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, um sal de sódio, conhecido como ATX-S10·Na, é particularmente eficaz. Assim, a presente invenção refere-se a um medicamento para utilização na TFD da queratose inflamatória e a um agente terapêutico para utilização na TFD da queratose inflamatória; em que o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável compreende ATX-S10·Na, um sal de sódio.

Breve descrição dos desenhos

A Fig. 1 é um gráfico que mostra a viabilidade de HUVECs em TFD utilizando o ATX-S10·Na da presente invenção.

A Fig. 2 compreende fotografias que mostram as aparências visuais de um modelo de rato no qual foi injectado colagénio tipo II para induzir artrite e não foi providenciada irradiação com laser em TFD (grupo de Controlo).

A Fig. 3 compreende fotografias que mostram as aparências visuais de um modelo de rato no qual foi injectado

colagénio tipo II para induzir artrite e que foi irradiado com laser em TFD (grupo de Ensaio). As imagens mostram o rato 7 dias após irradiação de laser.

A Fig. 4 compreende micrografias que mostram uma lâmina de tecido da articulação de um modelo de rato com artrite induzida por colagénio tipo II sem irradiação por laser providenciada em TFD (grupo de Controlo).

A Fig. 5 compreende micrografias que mostram uma lâmina de tecido da articulação de um modelo de rato com artrite induzida por colagénio tipo II após irradiação com laser em TFD (grupo de Ensaio).

A Fig. 6 é um gráfico que mostra os efeitos citotóxicos da TFD utilizando o ATX-S10·Na da presente invenção sobre queranócitos cultivados. Adicionaram-se 50 µg/mL de ATX-S10·Na da presente invenção à cultura de células. Após um período de cultura pré-determinado, as células foram lavadas com PBS e foram irradiadas com laser a 10 J/cm². A viabilidade dos queranócitos foi determinada 1, 2, 3, 6, 12, e 24 horas após a irradiação e foi representada num gráfico.

A Fig. 7 compreende imagens de fluorescência de um modelo de rato com dermatite, tiradas 3 horas após a aplicação de um unguento hidrófilo com ou sem ATX-S10·Na. As imagens são (a) com o unguento hidrófilo contendo ATX-S10·Na, e (b) com o unguento hidrófilo sem conter ATX-S10·Na.

A Fig. 8 compreende micrografias de secções de tecido da pele obtidas de um modelo de rato de dermatite. As imagens foram tiradas 3 horas após aplicação de um unguento hidrófilo contendo 1% de ATX-S10·Na na pele tratada com TPA. As imagens são (a) com irradiação por laser e (b) sem irradiação por laser.

A Fig. 9 compreende imagens de fluorescência tiradas após a administração de Photofrin. As duas imagens do topo mostram 5 minutos (esquerda) e 10 minutos após a administração. As imagens do meio mostram 15 minutos (esquerda) e 20 minutos após a administração. As imagens de baixo mostram 25 minutos (esquerda) e 30 minutos após a administração.

A Fig. 10 compreende imagens de fluorescência tiradas após a administração do ATX-S10·Na da presente invenção. As duas imagens do topo mostram 5 minutos (esquerda) e 10 minutos após a administração. As imagens do meio mostram 15 minutos (esquerda) e 20 minutos após a administração. As imagens de baixo mostram 25 minutos (esquerda) e 30 minutos após a administração.

Melhor modo de realização da invenção

A concretização individual da presente invenção será agora descrita em detalhe com referência aos Exemplos de Ensaio.

Um derivado particular de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis utilizados como um ingrediente activo na presente invenção podem ser produzidos por, por exemplo, um método descrito em WO 98/14453. Exemplos dos sais farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de sódio, sais de potássio e sais de cálcio. Destes, os sais de sódio são particularmente preferidos e um sal de sódio de um certo derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) recebeu a designação ATX-S10·Na.

Ensaio 1 (ensaio *in vitro*): Efeitos da TFD sobre células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)

Como primeiro passo, determinou-se se a morte celular de HUVECs inflamadas pode ser induzida por TFD.

As HUVECs foram semeadas num meio de cultura a $1,0 \times 10^{-4}$ células/poço. Após um período de cultura pré-determinado, adicionaram-se IL-1 β (1 ng/mL) e TNF- α (10 ng/mL) para estimular as células e, deste modo, provocar inflamação das células. Após um período de estimulação de 1 hora, as células foram divididas em dois grupos e adicionaram-se 25 μ g/ml de ATX-S10·Na da presente invenção a um grupo e 50 μ g/ml de ATX-S10·Na ao outro grupo. Subsequentemente, as células foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

Após o período de incubação, irradiou-se laser sobre as células cultivadas (cada grupo de dosagem foi dividido em

cinco subgrupos, que foram irradiados a 0, 15, 30, 50, e 100 J/cm²). 24 horas após a irradiação, a viabilidade das HUVECs foi determinada por meio de um ensaio MTT.

Os resultados indicam que não foi observada morte celular nos grupos não irradiados, enquanto que a viabilidade das HUVECs estava dentro do intervalo de aproximadamente 10 a 20% em cada um dos grupos irradiados (os grupos irradiados a 15, 30, 50, e 100 J/cm²). Cada um dos grupos que recebeu 25 µg/mL de ATX-S10·Na mostrou uma viabilidade comparável à do grupo correspondente que recebeu 50 µg/mL de ATX-S10·Na (Fig. 1).

Estes resultados sugerem que o ATX-S10·Na, quando utilizado em TFD, induz a morte celular de HUVECs inflamadas.

Em seguida, utilizando o presente modelo de ratinho com artrite induzida por colagénio tipo II, realizou-se o ensaio que se segue para examinar os efeitos da TFD utilizando ATX-S10·Na sobre a artrite.

Ensaio de Referência 2 (ensaio *in vivo*): Efeitos da TFD sobre modelo de ratinho com artrite induzida por colagénio tipo II

Foram utilizados ratinhos DBA/1 macho com 6 a 8 semanas de idade e pesando 15 a 18 g. Foi induzida artrite por colagénio tipo II de acordo com o esquema seguinte.

No Dia 0 foram injectados intraperitonealmente 2 mg de cocktail de anticorpos anti-colagénio tipo II. No Dia 1 foram injectados novamente 2 mg de cocktail de anticorpos anti-colagénio tipo II. No Dia 2 e no Dia 3 foram injectados intraperitonealmente 50 µg de lipopolissacárido (LPS) para induzir artrite por colagénio tipo II.

No Dia 5 a indução da artrite por colagénio tipo II foi confirmada. Um grupo de ensaio de 5 animais e um grupo de controlo de 3 animais receberam uma injeção intravenosa com 5 mg/kg de ATX-S10·Na. O grupo de ensaio foi exposto a irradiação com laser (dose: 30 J/cm²), 3 horas após a administração de ATX-S10·Na. No Dia 14, cada animal foi

observado em relação aos efeitos clínicos tal como medidos pela classificação clínica de artrite (Terato et al., 1995). Cada animal foi fixado por perfusão e o tecido da articulação foi recolhido e corado com Safranina 0. A amostra de tecido descalcificada resultante foi submetida a análise histológica.

Os resultados da análise revelaram que o grupo de controlo não irradiado exibiu continuamente sintomas de artrite, dando uma classificação de artrite de 4 (Fig. 2), enquanto não foram observados nenhuns ou muito poucos sintomas de artrite no grupo de ensaio irradiado, indicando uma classificação de artrite de 0 ou 1 (Fig. 3).

Na análise histológica observou-se uma infiltração significativa de células sinoviais no grupo de controlo (Fig. 4), enquanto a infiltração sinovial foi suprimida no grupo de ensaio (Fig. 5).

Estas observações demonstram que o ATX-S10·Na, um derivado de ácido aspártico iminoclorado da presente invenção é altamente eficaz quando utilizado em TFD para tratar a artrite reumatóide.

Os derivados convencionais de porfirina são acompanhados por fotossensibilidade e outros efeitos secundários uma vez que têm uma capacidade relativamente baixa para se acumularem selectivamente num tecido particular e são metabolizados lentamente em tecidos normais. Assim, os tratamentos com estes derivados de porfirina têm que ser realizados num ambiente escuro. Em contraste, o ATX-S10·Na, o derivado de ácido aspártico iminoclorado da presente invenção tem uma capacidade elevada para se acumular selectivamente em células inflamadas e tumores mas é facilmente metabolizado em tecidos normais. Assim, o ATX-S10·Na provoca, se provocar, efeitos secundários significativamente reduzidos tais como fotossensibilidade. Adicionalmente, o composto absorve luz com um comprimento de onda que penetra mais fundo no tecido (670 nm) e pode assim ser utilizado em terapias em que são utilizadas fontes externas de luz laser.

Os reumatismos articulares, em particular as sinovites intratáveis resistentes ao tratamento com drogas, são geralmente tratados por injeção intra-articular de esteróides, sinovectomia artroscópica e sinovectomia aberta. A administração de esteróides está associada ao risco de infecção e é invasiva. Por outro lado, alguns esteróides são inapropriados para administração repetitiva em articulações. A sinovectomia artroscópica ou aberta necessita de hospitalização, é invasiva e por vezes requer uma reabilitação considerável.

Em comparação, a TFD para o tratamento da artrite reumatóide envolve a injeção intravenosa do fotossensibilizador que se acumula selectivamente nas articulações para induzir a necrose de células sinoviais e desta forma suprimir a destruição das articulações. O método oferece assim uma terapia não invasiva altamente eficaz.

Uma segunda concretização da presente invenção refere-se a um método de TFD para o tratamento de queratose inflamatória (Psoríase e outras doenças de pele) e a um agente terapêutico para utilização na TFD da queratose inflamatória. O método de TFD ou o agente terapêutico compreendem como ingrediente activo, um derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em particular ATX-S10·Na, um sal de sódio do composto.

A queratose inflamatória é uma doença de pele caracterizada por ruborização e queratinização, um sintoma notável de inflamação. A doença inclui psoríase e parapsoríase com as suas características clínicas próprias incluindo eritrodermia psoriática, psoríase artropática e psoríase pustular.

Os presentes inventores exploraram a capacidade do derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável, em particular, ATX-S10·Na, para se acumular eficazmente em células inflamadas e prepararam um unguento hidrófilo que contém ATX-S10·Na e um unguento hidrófilo de base descrito em *Japanese Pharmacopoeia*. Os inventores aplicaram então o

unguento à pele, removeram-no por lavagem da pele e obtiveram uma imagem de fluorescência que confirmou que o ATX-S10·Na se tinha acumulado na pele.

Por irradiação com laser nesta etapa para realizar a TFD, a necrose das células inflamadas pode ser induzida e, deste modo a queratose inflamatória deve ser tratada eficazmente. Os inventores realizaram o ensaio seguinte para verificar esta teoria.

Ensaio 3 (ensaio *in vitro*): Citotoxicidade contra queranócitos cultivados

Recolheram-se queranócitos de um paciente com queratose inflamatória e foram cultivados a 37°C durante 24 horas. À cultura de células adicionaram-se 50 µg/mL de ATX-S10·Na da presente invenção e as células foram ainda cultivadas sob as mesmas condições. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS, foram irradiadas com laser a 10 J/cm², e foram observadas quanto à viabilidade ao longo do tempo.

Assumindo o número inicial de células viáveis no meio de cultura antes da irradiação com laser como sendo 100%, a viabilidade das células foi determinada 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas após a irradiação. Os resultados são apresentados na Fig. 6. Como mostrado, 75% dos queranócitos incubados com ATX-S10·Na morreram 6 horas após a irradiação com laser.

Utilizando o modelo de ratinho de dermatite, os inventores conduziram ainda o ensaio que se segue para examinar os efeitos de TFD utilizando ATX-S10·Na na doença.

Ensaio 4 (ensaio *in vivo*): Indução de dermatite na pele de rato por tratamento com acetato de tetradecanoil-forbol (TPA) e efeitos terapêuticos da TFD após aplicação de unguento de ATX-S10·Na

1) Preparação do unguento de ATX-S10·Na

Utilizando um unguento hidrófilo de base descrito em *Japanese Pharmacopoeia*, foram preparados por uma técnica farmacêutica comum dois ungentos hidrófilos, um contendo 1% de ATX-S10·Na e o outro 10% do composto.

2) Indução de dermatite inflamatória

Ratinhos DBA/1 macho, com 6 a 8 semanas de idade e pesando 15 a 18 g, foram rapados com um tosquiador e com uma navalha. Aplicou-se então TPA à pele para induzir dermatite.

3) A um grupo de ensaio foi aplicado o unguento hidrófilo contendo 1% de ATX-S10·Na. O unguento foi aplicado à região da pele onde a dermatite foi induzida e foi removido por lavagem após 3 horas. A um grupo de controlo foi aplicado um unguento hidrófilo livre de ATX-S10·Na e foi também removido por lavagem após a aplicação. As imagens de fluorescência obtidas 3 horas após a aplicação mostraram fluorescência avermelhada no grupo de ensaio mas não no grupo de controlo, indicando a presença de ATX-S10·Na acumulado na pele (Fig. 7).

4) Irradiação com laser em TFD

O grupo de ensaio foi então dividido em dois subgrupos: um grupo foi irradiado com laser a 100 J/cm^2 e o outro grupo não foi irradiado. Foi observada a histologia da pele de cada animal.

Os resultados indicam que a dermatite causada por TPA (região inflamada) se manteve no grupo não irradiado enquanto se observou uma diminuição significativa na região inflamada no grupo irradiado. Isto demonstra que quando utilizado em TFD, o ATX-S10·Na da presente invenção serve para aliviar significativamente a dermatite.

Micrografias de secções transversais de tecidos de pele com e sem irradiação com laser são mostradas na Fig. 8.

Ficou assim demonstrado que o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em particular, ATX-S10·Na, se acumula efectivamente em células inflamadas. As células são então expostas a irradiação por laser em TFD para induzir necrose das células inflamadas e deste modo tratar eficazmente a queratose inflamatória.

Ensaio de Referência 5: Determinação da localização do nódulo linfático sentinela e de metástases de cancro na almofada plantar de murinos

Foram utilizados ratinhos DBA/1 macho, com 6 a 8 semanas e pesando 15 a 18 g. Inocularam-se células cancerosas Meth-A na almofada plantar de cada animal, e injectaram-se 0,02 mg/20 µl de ATX-S10·Na para actuar como composto de ensaio na região do tumor. Utilizando um sistema de imagiação fluorescente a localização do NS foi identificada e a presença de metástases de cancro foi determinada ao longo do período seguinte de 30 minutos.

Como composto de controlo, foi também injectada Photofrin, um composto de porfirina por via intravenosa. As condições referentes ao sistema de imagiação fluorescente são as seguintes:

Câmara: Câmara a Cores ICCD

Lentes: Micro-Nikkor f55 mm (F 2.8)

Filtros para cortar a luz de excitação: Y52*2

Campo de visão: 39 mm

Luz de excitação: Unidade de fonte luminosa (L7212), lentes (E5147-06); fibra óptica (A2873)

Filtros: XYZ*2 + B39 + B37

Distância de projecção: 145 mm

As condições referentes à captura de imagem são as seguintes: S-VHS -> DV -> DV Raptor (DV vídeo) Regulações padrão

Tamanho da imagem: Resolução 640×480 Formato DV

(Brilho = 128, contraste = 199, espessura de cor = 192, tonalidade = 128, nitidez = 1)

A Fig. 9 mostra imagens obtidas para Photofrin (referida simplesmente como PF daqui em diante) como composto de controlo e a Fig. 10 mostra imagens obtidas para o ATX-S10·Na da presente invenção (referido simplesmente como S10, daqui em diante).

Como mostrado, a localização do NS foi claramente indicada pela injeção de ATX-S10·Na.

Subsequentemente, o NS foi recolhido e colocado num tubo de ensaio. Adicionaram-se 500 µL de solução aquosa de 0,3% de ácido tricloroacético/60% de MeOH e o tecido foi sonificado à

temperatura ambiente durante 10 minutos. O produto sonificado foi transferido para um tubo eppendorf e foi centrifugado (8000×G, 10 min., 4°C). Colocaram-se 200 µL do sobrenadante numa placa de fundo plano de 96 poços (Nalge Nunc 167008) e a fluorescência foi determinada por um leitor de placa de fluorescência (CytoFluor 2350, Millipore). A fluorescência foi medida a um comprimento de onda de excitação de 420 nm e a um comprimento de emissão de fluorescência de 645 nm. O nível de ATX-S10·Na no NS foi determinado como sendo uma quantidade vestigiária de 10 a 20 ng/mg, o que provou a elevada sensibilidade do método.

Assim, a localização do NS pode ser determinada pela utilização do derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) da presente invenção. Uma vez localizado o NS, realiza-se a biópsia para determinar se o cancro metastizou.

A determinação de metástases de cancro para o NS torna possível determinar se o cancro metastizou para todo o sistema linfático e, deste modo, oferece uma direcção para futuros diagnósticos e tratamentos.

Aplicabilidade industrial

Como estabelecido, tirando vantagem da grande capacidade do derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I), em particular de ATX-S10·Na, um sal de sódio do composto, para se acumular em células inflamadas, a presente invenção proporciona um agente terapêutico para utilização na TFD da queratose inflamatória.

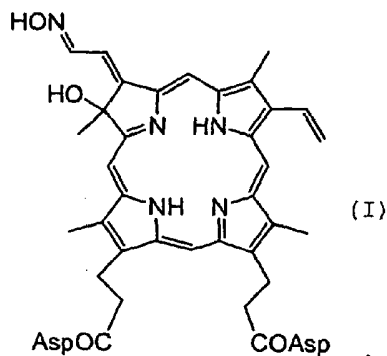
No que se refere aos agentes terapêuticos para a queratose inflamatória, nenhum dos agentes anti-inflamatórios convencionais, inibidores do crescimento epidérmico ou terapias por UV (e.g. PUVA) proporcionam um tratamento decisivo. A TFD utilizando cloridrato de ácido 5-amino-levulínico (5-ALA) falha também no fornecimento de efeitos terapêuticos devido à baixa capacidade do composto para se acumular em neovascularizações e ao comprimento de onda de máximo de absorção do composto (630 nm). Em contraste, os agentes terapêuticos da presente invenção, que se acumulam eficazmente em células inflamatórias subepidérmicas quando

administrados por via percutânea, podem ser utilizados em TFD na qual os compostos acumulados são expostos a irradiação por laser para tratar eficazmente a doença.

Lisboa, 2008-09-25

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I)



em que Asp representa um resíduo de ácido aspártico; ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável para a preparação de um medicamento para o tratamento de queratose inflamatória por terapia fotodinâmica (TFD).

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável é um sal de sódio.

3. Agente terapêutico para utilização na TFD de queratose inflamatória que compreende como ingrediente activo o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1 ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

4. Agente terapêutico de acordo com a reivindicação 3, em que o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável é um sal de sódio.

5. Utilização do derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1 ou de um seu sal farmacêuticamente aceitável para a preparação de um medicamento para utilização na TFD de queratose inflamatória.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o derivado de ácido aspártico iminoclorado de fórmula (I) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável é um sal de sódio.

Figura 1

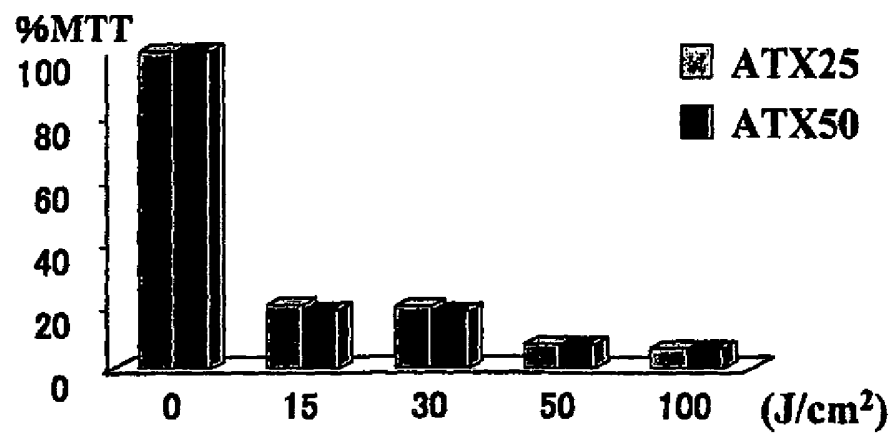


Figura 2



Figura 3

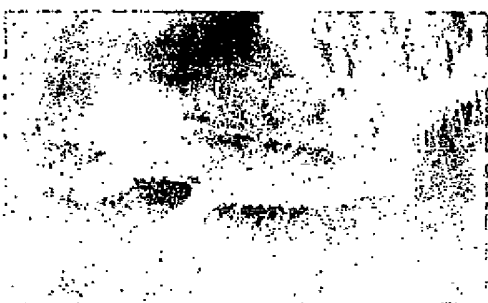
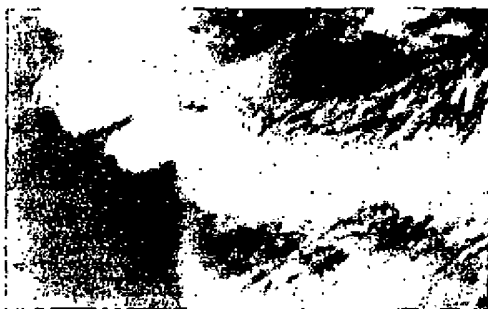


Figura 4

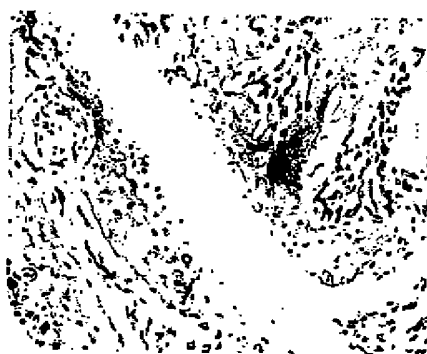


Figura 5

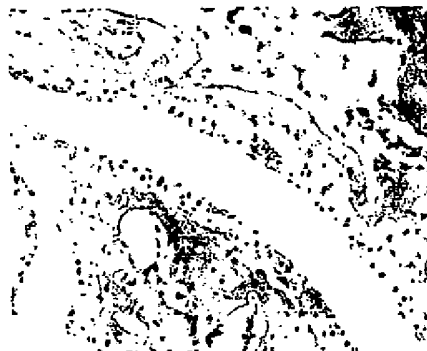


Figura 6

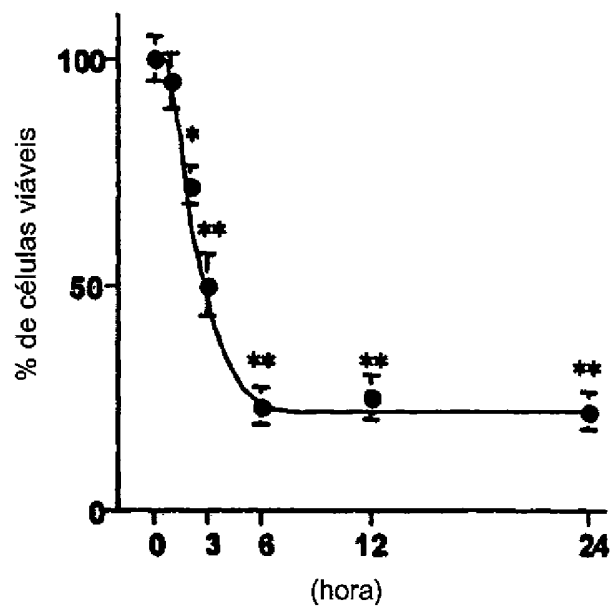


Figura 7



Figura 8



Figura 9



Figura 10

