

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

(21) **PI0608818-0 A2**



\* B R P I 0 6 0 8 8 1 8 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 07/03/2006  
(43) Data da Publicação: 26/01/2010  
(RPI 2038)

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/451 (2010.01)  
A61K 31/485 (2010.01)  
A61K 39/395 (2010.01)  
A61K 45/06 (2010.01)

(54) Título: **USO DE ANTAGONISTA OPIÓIDES PARA ATENUAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS**

(30) Prioridade Unionista: 07/03/2005 US 60/659.193, 12/10/2005 US 60/725.703, 28/10/2005 US 60/731.009, 20/01/2006 US 60/760.851, 20/01/2006 US 60/760.851, 20/01/2006 US 60/760.851, 20/01/2006 US 60/760.851

(57) Resumo: USO DE ANTAGONISTAS OPIÓIDES PARA ATENUAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS. A invenção provê métodos de atenuação, por exemplo, inibição ou redução, de proliferação e migração celular, particularmente proliferação e migração de célula endotelial, incluindo aquela associada com angiogênese, usando antagonistas opióides, incluindo, mas não limitado a, aqueles que são antagonistas restritos perifericamente.

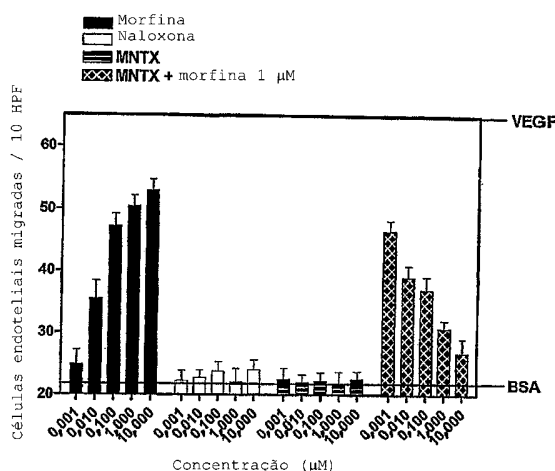
(73) Titular(es): THE UNIVERSITY OF CHICAGO

(72) Inventor(es): JOE G. N. GARCIA, JONATHAN MOSS, MARK LINGEN, PATRICK A. SINGLETON

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2006007892 de 07/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/096626 de 14/09/2006



"USO DE ANTAGONISTAS OPIÓIDES PARA ATENUAÇÃO DE  
PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS"

Declaração Com Relação a Pesquisa ou Desenvolvi-  
mento Com Suporte Federal

5                Esta invenção foi suportada em parte por subven-  
ções de National Institutes of Health: DE12322; DE00470; e  
DE015830. O governo dos Estados Unidos tem certos direitos  
nesta invenção.

Pedidos Relacionados

10              Este pedido de patente reivindica benefício sob 35  
U.S.C. 119(e) das datas de depósito de USSN 60/659 193 depo-  
sitado em 7 de março de 2005, 60/725 703 depositado em 12 de  
outubro de 2005, 60/731 009 depositado em 28 de outubro de  
2005, e 60/760 851 depositado em 20 de janeiro de 2006, as  
15 inteiras exposições dos quais são aqui incorporadas por re-  
ferência.

Campo da Invenção

A invenção refere-se a processos de atenuação de  
migração e/ou proliferação de células endoteliais, especial-  
20 mente associadas com tumores, utilizando antagonistas de o-  
pióides.

Introdução

Proliferação celular é um processo em andamento  
normal em todos os organismos vivos que envolve numerosos  
25 fatores e sinais que são delicadamente balanceados para man-  
ter ciclos celulares regulares. Se ou não células mamíferas  
crescerão e dividirão é determinado por uma variedade de me-  
canismo controle de retroalimentação, que inclui a disponi-

bilidade de espaço onde uma célula pode crescer, e a secreção de específicos fatores estimuladores e inibidores no ambiente imediato.

Angiogênese e doenças relacionadas com angiogênese são afetadas por proliferação celular. O processo de angiogênese resulta na formação de novos vasos sanguíneos. Sob condições fisiológicas normais, animais, incluindo humanos, sofrem angiogênese somente em situações restritas muito específicas. Por exemplo, angiogênese é normalmente observada em cura de ferimento, desenvolvimento fetal e embriônico e formação do corpus luteum, endométrio e placenta.

Durante o processo de angiogênese, células endoteliais, que normalmente existem em um estado quiescente como parte de um vaso sanguíneo existente, entre em um estado proliferativo, migratório. Este estado proliferativo, migratório de células endoteliais é eventualmente resolvido quando as células retornam ao estado quiescente como parte de um novo vaso sanguíneo funcional. A geração de novos capilares envolve um processo complexo que requer um número de eventos celulares e moleculares para ocorrer ambos, um padrão espacial e temporal. Algumas destas atividades incluem a degradação da membrana base circundante do vaso originário, a migração das células endoteliais através de estroma de tecido conjuntivo, proliferação de células, a formação de estruturas semelhantes a tubos, e a maturação destes tubos forrados endoteliais em novos vasos sanguíneos. (Cliff, 1963; Schoefl, 1963; Ausprunck and Folkman, 1977). Alguns fatores angiogênicos essenciais incluem fator básico de crescimento

de fibroblasto, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoietinas, citocinas, proteínas de matriz extracelular, e metaloproteases de matriz. Estes fatores são produzidos localmente por células estromais e por leucócitos  
5 ativados que são recrutados para a área (Risau, W. (1997) *nature* 386(6626):671-674; Risau and Flamme (1995) *Ann. Ver. Cell Dev. Biol.* 11:73-91). Diferente de outros fatores angiogênicos, VEGF atua como um mitógeno específico de célula endotelial durante angiogênese (Terman et al., 1992 and Fer-  
10 rara, 1993).

Angiogênese pode ser estimulada e utilizada por alguns neoplasmas (por exemplo, tumores) para aumento de tomada de nutriente. Foi verificado que angiogênese é essencial para o crescimento de tumores sólidos além de 2-3 mm em  
15 diâmetro e para metástase de tumor (Folkman, 1995; revisto em Bouck et al., 1996). Em contraste a angiogênese normal, que conduz a anastomoses e maturação capilar, angiogênese associada com neoplasia é um processo contínuo. Células endoteliais são ativadas por células neoplásticas vizinhas para  
20 secretarem não somente VEGF que estimula angiogênese, mas também metaloproteases matrizes (MMP) que degradam a matriz extracelular circundante. As células endoteliais então invadem a matriz extracelular onde elas migram, proliferam, e se organizam para formação de novos vasos sanguíneos, que su-  
25 portam crescimento e sobrevivência de neoplasma .

O neoplasma recentemente vascularizado continua a crescer, conduzindo a ainda privação de nutriente e sinalização pró-angiogênica crônica. A vasculatura de neoplasmas é

caracterizada pela presença de lacunas e uma baixa taxa de anastomoses. Esta vasculatura parcialmente disfuncional alimenta a permanente requisição de angiogênese. Adicionalmente, esta vasculatura incompleta permite derramamento de células neoplásticas na circulação sistêmica. Portanto, o potencial angiogênico de um neoplasma correlaciona-se com potencial de metástase. (Weidner et al. (1991) N. Engl. J. Med. 324(1):1-8; Folkman and Shing (1992) J. Biol. Chem. 267(16):10931-10934).

10           Como uma significativa proporção de neoplasmas são dependentes de continuada angiogênese, inibição de angiogênese bloqueia crescimento de neoplasma o que freqüentemente conduz a completa necrose do neoplasma. (Weidner et al. (1991) N. Engl. J. Med. 324(1):1-8; Folkman and Shing (1992) J. Biol. Chem. 267(16):10931-10934).

15           Supressão de qualquer uma das etapas de e/ou fatores envolvidos em angiogênese pode inibir a formação de novos vasos, e por isso, afetar crescimento de tumor e geração de metástases. Realmente, foi estimado que a eliminação de uma célula endotelial simples pode inibir o crescimento de 100 células de tumor (Thorpe et al., 1995). Também foi verificado que anticorpos elevados contra o fator angiogênico VEGF foram mostrados suprimirem crescimento de tumor in vivo (Kim et al., 1993).

25           Como parte de tratamento e gerenciamento de pacientes com câncer e muitas condições médicas, agonistas de opióides, como morfina, são amplamente usados para dor associada. Por exemplo, morfina é usada na fase terminal de cui-

dados de aproximadamente metade dos pacientes que morrem de  
câncer cada ano nos Estados Unidos. Agonistas de opióides,  
como morfina compreendem um grupo de compostos que atuam so-  
bre uma série de receptores de opióides endógenos, tais como  
5 mu-, kapa-, e delta-receptores em sistemas biológicos. Nor-  
malmente, estes receptores endógenos ligam opióides endóge-  
nos. Opióides endógenos são nativamente produzidos por célu-  
las mamíferas. Opióides endógenos incluem beta-endorfinas,  
encefalinas, e dinorfinas. Beta-endorfinas mostram uma pre-  
10 ferência por receptores mu, encefalinas por receptores delta  
e dinorfinas por receptores kapa. Agonistas de opióides são  
classificados por seus efeitos preferenciais sobre os recep-  
tores opióides endógenos. Genericamente, o receptor - um es-  
tá associado com alívio de dor, e dependência química (por  
15 exemplo, vício de drogas e alcoolismo). Morfina, por exem-  
plo, é um agonista de opióide-mu. Receptores de opióides não  
são limitados ao cérebro e sistema nervoso central (CNS),  
por exemplo, a receptores centrais. Receptores de opióides  
periféricos podem ser encontrados em outros tecidos por todo  
20 o corpo, por exemplo, tecido gastrointestinal.

A despeito de amplo uso em gerenciamento de dor,  
morfina e outras medicações opióides podem ter severos efei-  
tos colaterais que podem ser causados por ativação dos re-  
ceptores periféricos. Os efeitos colaterais podem ser de di-  
25 fícil gerenciamento e podem resultar em o paciente refutando  
gerenciamento de dor baseado em opióide. Efeitos colaterais  
de tratamento com opióide incluem náusea, constipação, ini-  
bição de motilidade gastrointestinal, supressão respiratória

e imuno-supressão. Adicionalmente, morfina e outros agonistas de receptor de opióide podem estimular proliferação de células endoteliais microvasculares humanas e angiogênese in vitro e in vivo em concentrações típicas no sangue de morfina ou equivalente de morfina. Esta atividade pró-angiogênese dos agonistas de opióides, embora paliativa para dor, pode acelerar progressão de tumor.

Antagonistas de opióides são classificados similarmente por seus efeitos sobre os receptores de opióides, por exemplo, por sua habilidade para antagonizar um receptor mais efetivamente que um outro receptor. Por exemplo, o antagonista de opióide naloxona atua como um antagonista competitivo de todos os receptores de opióide, mas é aproximadamente dez vezes mais efetivo em receptores-mu que em receptores kapa, e é, por isso, classificado como um antagonista de opióide-mu. Antagonistas de opióides podem antagonizar receptores centrais, receptores periféricos ou ambos. Antagonistas de opióides, e em particular antagonistas de opióides periféricos, têm sido usados para diminuir os efeitos colaterais de opióides administrados exogenamente, assim como para diminuição de indesejados efeitos de excessivos opióides endógenos. Antagonistas de opióides também foram examinados para seu potencial uso como agentes anti-câncer para particulares tipos de câncer, como descrito em patentes US 6 384 044 e 6 136 780 e na literatura científica Gupta et al. Cancer Research, 62:4491-98 (2002). Os efeitos anti-câncer de antagonistas de opióides são controversos e não bem entendidos, mas foi mantido que os efeitos anti-câncer

de antagonista de opióide, na extensão em que eles foram mostrados, não são relacionados a angiogênese (Poonawala T, et al., Wound Repair Regen. 2005 Mar-Apr; 13(2):165-74; Popov I., Acta Chir. Iugosl. 2004;51(2):117-221; Blebea J., et al., J Vasc Surg. 2002 Mar; 35(3):532-8; Balasubramanian S, et al., J Mol Cell Cardiol. 2001 Dec;33(12):2179-87; Zagon IS, et al., Int J Oncol. 2000Nov;17(5):1053-61; Blebea J et al., J Vasc Surg. 2000 Aug; 32(2):364-73; Pasi A, et al., Gen Pharmacol. (1991;22(6):1077-9). De fato, foi reportado que em modelo de tumor de xenoenxerto em camundongos, o antagonista de opióide naloxona não exibe um efeito significativo sobre angiogênese induzida por morfina. Gupta et al. Cancer Research, 62:4491-98 (2002). Por isso, é surpreendente que seja agora verificado que antagonistas de opióides possam inibir proliferação e migração endotelial associadas com angiogênese.

#### Breve Descrição da Invenção

A invenção provê processos de atenuação, por exemplo, inibição ou redução, de proliferação e migração celular, particularmente proliferação e migração de células endoteliais, incluindo aquelas associadas com angiogênese, usando antagonistas de opióides, incluindo, mas não limitado àqueles que são antagonistas restritos periféricamente.

De acordo com um aspecto da invenção, um processo de tratamento é provido. O processo envolve administração a um sujeito com um distúrbio caracterizado por indesejada migração ou proliferação de células endoteliais de uma efetiva quantidade de um antagonista de opióide. O tratamento pode



inibir uma ou ambas de migração e proliferação. A indesejada migração ou proliferação de células endoteliais pode ser indesejada migração ou proliferação de células endoteliais vasculares, incluindo, mas não limitada a, indesejada neovascularização ou angiogênese. Exemplos de neovascularização indesejada incluem, mas não são limitadas a, neovascularização associada com câncer e neovascularização ocular. A desordem pode ser qualquer desordem caracterizada por indesejada migração ou proliferação de células endoteliais. Tais desordens importantes são câncer, anemia de célula foice, ferimentos vasculares, retinopatias proliferativas e indesejada proliferação de células endoteliais nos rins e pulmão.

Em realizações importantes, o antagonista de opióide é um antagonista de opióide periférico. Antagonistas de opióide periféricos incluem, mas não são limitados a, derivados de morfina quaternários ou terciários, N-álquil carboxilatos de piperidina, e benzomorfans quaternários. Um tal importante antagonista de opióide periférico é metil naltrexona. Um outro antagonista de opióide é alvimopan. Em realizações importantes, a quantidade efetiva é tal que o sujeito tem efetivos níveis em plasma de sangue circulante do antagonista de opióide continuamente por pelo menos 1 semana, pelo menos 2 semanas, pelo menos três semanas e, preferivelmente, pelo menos 4 semanas.

A invenção também inclui a co-administração dos antagonistas de opióides com agentes que não são antagonistas de opióides, mas que são não obstante úteis em tratamento de distúrbios caracterizados por indesejada migração ou

proliferação de células endoteliais. Exemplos de tais agentes incluem agentes anti-câncer, agentes anti-neovascularização (por exemplo, anticorpo monoclonal anti-VEGF), agentes anti-diabetes, agentes anti-célula foice, agentes de cura de ferimento, e agentes anti-proliferação de células endoteliais.

Será entendido que os sujeitos podem ou não estar em simultânea terapia de opióide, dependendo do particular distúrbio que o sujeito tenha, a seriedade do distúrbio, e a necessidade que o sujeito tenha de gerenciamento de dor. Em algumas realizações, o sujeito está tomando simultânea terapia de opióide. Em algumas realizações, o sujeito está tomando simultânea terapia de opióide crônica. Em algumas realizações, o sujeito não está tomando simultânea terapia de opióide crônica.

De acordo com um outro aspecto da invenção, um processo de inibição de atividade VEGF em células endoteliais é provido. O processo envolve contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista de opióide.

De acordo com um outro aspecto da invenção, um processo de inibição de migração ou proliferação celular induzida por opióide exógeno em células endoteliais é provido. O processo envolve contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista de opióide.

De acordo com um outro aspecto da invenção, um processo de inibição de ativação de Rho A em células endoteliais é provido. O processo envolve contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista de opióide.

De acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, o antagonista de opióide preferivelmente é um antagonista de opióide periférico, e mais preferivelmente é metil naltrexona.

5           A invenção provê processos de atenuação de migração e/ou proliferação de células endoteliais de um tumor ou câncer, compreendendo contato de células com uma quantidade anti-migratória ou anti-proliferativa de um antagonista de opióide. Em um outro aspecto, a invenção provê processos de  
10   atenuação de angiogênese associada com câncer. Assim, a invenção contempla tratamento de um paciente de câncer humano, por exemplo, através de um processo de atenuação de angiogênese em um tecido canceroso de um paciente, compreendendo administração ao tecido canceroso de uma quantidade efetiva  
15   de um antagonista de opióide.

          A invenção também provê um processo de tratamento de neovascularização anormal, compreendendo administração a um paciente em necessidade de tal tratamento, de uma quantidade de um antagonista de opióide efetiva para inibir a formação de vasos sanguíneos. A invenção também inclui um processo de atenuação de progressão e metástase de tumor em tecidos animais, compreendendo contato de células ou tecidos de tumor com uma quantidade inibindo o crescimento de um antagonista de opióide, e um processo de atenuação de proliferação de células hiperproliferativas em um sujeito, compreendendo administração ao sujeito de pelo menos um antagonista de opióide, em uma quantidade que é efetiva para atenuar proliferação das células hiperproliferativas.

Em uma realização, os antagonistas de opióides são usados peri-operativamente. Por "peri-operativamente", é pretendido antes (por exemplo, em preparação para), durante, e/ou imediatamente após uma cirurgia ou um procedimento endoscópico ou cirúrgico, por exemplo, colonoscopia, gastrolaparoscopia, e especialmente uma cirurgia ou procedimento cirúrgico envolvendo a remoção de um tumor. Os antagonistas de opióides atuam para atenuar a recorrência de e/ou a metástase do tumor, especialmente aquele surgindo de angiogênese associada com o mesmo.

É antecipado que o antagonista de opióide será preferivelmente dado em um regime de dosagem contínuo, por exemplo, um regime que mantém um mínimo, e mesmo mais preferivelmente um nível relativamente constante no sangue. É ainda contemplado que os processos da presente invenção podem ter valor profilático em certos distúrbios associados com angiogênese anormal. Assim, a invenção provê um processo de prevenção de aparecimento ou reaparecimento de um distúrbio em um mamífero, o distúrbio sendo caracterizado por indesejada migração ou proliferação de células endoteliais, incluindo angiogênese anormal, compreendendo administração a um mamífero em necessidade de tal tratamento, de uma efetiva quantidade de um antagonista de opióide, onde o distúrbio é um câncer, anemia de célula foice, doenças neovasculares oculares, diabetes, retinopatia ocular, ou outra indesejada proliferação endotelial nos rins, olhos ou pulmões. Por isso será entendido que, como aqui usado, tratamento de um sujeito com um distúrbio caracterizado por indesejada prolifera-

ção ou migração de células endoteliais inclui tratamento de um sujeito com um distúrbio ativo para inibir ou curar o distúrbio e tratamento de um sujeito para inibir um distúrbio de re-ocorrência. Por exemplo, o sujeito pode ter tido  
5 um tumor sólido removido, e o sujeito pode receber o tratamento para inibir a re-ocorrência de tumor.

Em atenuação de proliferação de células, a invenção provê um processo para o tratamento de anormal proliferação de células de uma célula expressando fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em um mamífero que compreende administração ao mamífero de uma quantidade terapêuticamente efetiva de um antagonista de opióide. A invenção também inclui um processo de tratamento de tecido canceroso em um sujeito compreendendo, administração ao sujeito de uma  
15 quantidade de um antagonista de opióide suficiente para inibir produção de VEGF no tecido canceroso, assim como um processo de tratamento de doença angiogênica, o processo compreendendo contato de um tecido ou uma população de células endoteliais com uma composição compreendendo uma quantidade  
20 de pelo menos um antagonista de opióide sob condições efetivas para inibir angiogênese induzida por VEGF e para tratar doença angiogênica.

Em um outro aspecto, a presente invenção provê um processo de inibição ou redução de angiogênese, particularmente angiogênese induzida por opióide, por exemplo, de células de tumor, através de administração ou provimento de um antagonista de opióide, particularmente um antagonista de opióide periférico, a células sofrendo angiogênese. Ainda em  
25

um aspecto, a invenção provê processos de tratamento de angiogênese induzida por opióide em pacientes recebendo tratamento de opióide ou em pacientes onde a angiogênese é induzida por opióides exógenos. O grupo anterior é de tipicamente  
5 te pacientes de câncer em gerenciamento de dor baseado em opióide. Os processos compreendem administração de um antagonista de opióide a um paciente em uma quantidade antiangiogênica, por exemplo, em uma quantidade suficiente para inibir ou reduzir a angiogênese induzida por opióide. Naqueles  
10 pacientes recebendo tratamento de opióide, o opióide e o antagonista de opióide periférico podem ser co-administrados. Antagonistas de opióides periféricos podem, assim, ser usados para inibição ou redução de efeitos angiogênicos de opióides sobre células de tumor, e atenuarem o crescimento de  
15 um tumor. Apropriados antagonistas de opióides genericamente incluem compostos amina heterocíclicos que pertencem a várias diferentes classes de compostos. Por exemplo, uma classe é apropriadamente derivados de morfinan, e em particular, derivados terciários de noroximorfona. Em uma realização, o  
20 derivado terciário de noroximorfona é, por exemplo, naloxona ou naltrexona.

Apropriados antagonistas de opióides periféricos são também genericamente compostos amina heterocíclicos que podem pertencer a várias diferentes classes de compostos.  
25 Por exemplo, uma classe é apropriadamente derivados quaternários de morfinan, e em particular, derivados quaternários de noroximorfona. Em uma realização, o derivado quaternário de noroximorfona é, por exemplo, N-metil naltrexona (ou sim-

plesmente metil naltrexona). Uma outra classe é a de piperidinas N-substituídas. Em uma realização, a N-piperidina é um N-alquil carbonilato de piperidina, tal como, por exemplo, alvimopan. Uma outra classe de compostos que pode ser de valor nos processos da presente invenção são os derivados quaternários de benzomorfanos.

Em algumas realizações da invenção, o antagonista de opióide pode ser um antagonista de opióide-mu. Em outras realizações, o antagonista de opióide pode ser um antagonista de opióide kapa. A invenção também abrange administração de mais de um antagonista de opióide, incluindo combinações de antagonistas de mu, combinações de antagonistas kapa e combinações de antagonistas de um e kapa, por exemplo, uma combinação de metil naltrexona e alvimopan, ou uma combinação de naltrexona e metil naltrexona.

Ainda em realizações, a invenção provê processos de tratamento de angiogênese induzida por opióide em pacientes recebendo um opióide, onde um antagonista de opióide periférico e pelo menos um outro agente terapêutico que não é um opióide ou antagonista de opióide são co-administrados ao paciente. Apropriados agentes terapêuticos incluem agentes anti-câncer (incluindo agentes quimioterapêuticos e agentes anti-neoplásticos), assim como outros agentes anti-angiogênese.

Ainda em um outro aspecto, a invenção provê um processo de redução de risco de recorrência de câncer ou tumor após intervenção médica (tal intervenção inclui mas não é limitada a cirurgia, por exemplo, cirurgia pulmonar, pro-

cedimentos endoscópicos e cirúrgicos, por exemplo, colonoscopia, gastrolaparoscopia, quimioterapia, etc.), compreendendo co-administração a um paciente de câncer de um antagonista de opióide. Assim, a invenção contempla, por exemplo, 5 um processo de minimização de recorrência pós-operatória de, por exemplo, câncer de mama em um paciente, compreendendo administração ao paciente de uma quantidade efetiva de um antagonista de opióide. Antagonistas de opióides periféricos de acordo com a presente invenção, por exemplo, MNTX, também 10 podem inibir VEGF, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), ou proliferação de células estimulada ou induzida por esfingosina 1-fosfato (SIP) nas células endoteliais.

#### Breve Descrição de Desenhos

A invenção pode ser melhor entendida e apreciada 15 por referência à descrição detalhada de realizações específicas aqui apresentadas em conjunção com os desenhos acompanhantes nos quais:

A Fig. 1 é um gráfico de barras de inibição dependente de dose de migração de célula endotelial microvascular humana (HMVEC), mostrando os resultados de Exemplo 1. 20

A Fig. 2 é um gráfico de barras de inibição dependente de dose de migração de células endoteliais microvasculares humanas, mostrando os resultados de Exemplo 2.

A Fig. 3 é um gráfico de barras de inibição dependente de dose de migração de HMVEC usando MNTX e MNTX + 25 DAMGO.

A Fig. 4 é um gráfico de barras de inibição dependente de dose de migração de HMVEC usando naloxona e naloxo-



na + DAMGO.

A Fig. 5 é um gráfico de barras de efeito dependente de dose de M3G e M6G sobre migração de HMVEC.

A Fig. 6 é uma fotomicrografia que mostra migração de células endoteliais induzida por morfina na presença e ausência de MNTX. Paineis A = Controle, Painel B = MS (sulfato de morfina), Painel C = MNTX, e Painel D = MS + MNTX. Setas são mostradas no Painel A para destacar várias células que migraram com sucesso através de membrana.

A Fig. 7 é um gráfico de barras de porcentagem de proliferação (A) e migração (B) de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de VEGF, morfina e DAMGO com ou sem MNTX.

A Fig. 8 é um painel de manchas imuno indicando a fosforilação (ativação) de tirosina de (A) de anti-VEGF R.1 (Flt-1) e 2 (Flk-1) usando VEGF R.1 ou 2 imuno-precipitado e anti-fosfo tirosina em células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de VEGF, morfina e DAMGO com ou sem MNTX e um gráfico de barras (B) de porcentagem de proliferação e migração de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de VEGF, morfina e DAMGO com ou sem inibidor de VEGF R.

A Fig. 9 é um painel de manchas imuno indicando ativação de RhoA usando anti-RhoA em células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de VEGF, morfina e DAMGO com ou sem MNTX (A) ou inibidor de VEGF R. (B).

A Fig. 10 é um painel de manchas imuno (A) de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na pre-

sença de siRNA misturado (alvejando nenhuma sequência de ARNm humana conhecida) ou RhoA siRNA e um gráfico de barras de porcentagem de proliferação (B) e migração (C) de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de VEGF, morfina e DAMGO com ou sem siRNA misturado (alvejando nenhuma sequência de ARNm humana conhecida) ou RhoA siRNA.

A Fig. 11 é um diagrama esquemático resumindo o mecanismo de efeitos de MNTX sobre angiogênese.

10 A Fig. 12 é um gráfico de barras de porcentagem de proliferação acima de controle de células endoteliais microvasculares pulmonares na presença de S1 P, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO com ou sem MNTX.

A Fig. 13 é um gráfico de barras de porcentagem de migração acima de controle de células endoteliais microvasculares na presença de S1P, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO com ou sem MNTX.

A Fig. 14 é um gráfico de barras de porcentagem de proliferação acima de controle de células endoteliais microvasculares pulmonares na presença de S1P, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO com siRNA misturado (controle) ou com siRNA de receptor de opióide mu.

A Fig. 15 é um gráfico de barras de porcentagem de migração acima de controle de células endoteliais microvasculares pulmonares na presença de S1P, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO com siRNA misturado (controle) ou com siRNA de receptor de opióide mu.

A Fig. 16 é um painel de manchas imuno indicando

fosforilação (ativação) do receptor de opióide mu usando receptor de opióide mu imuno-precipitado e (A,C) anti-fosfo-serina, (B,D) anti-fosfo-treonina de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de morfina, DAMGO, S1P, VEGF, PDGF com MNTX (C,D) ou sem MNTX (A,B); (E) é uma mancha imuno de receptor de opióide anti-mu.

A Fig. 17 é uma mancha imuno anti-RhoA de (A,B) RhoA ativado e (C) RhoA total de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de morfina, DAMGO, S1P, VEGF, PDGF com MNTX (B) e sem MNTX (A).

A Fig. 18 é um painel de manchas imuno de painel superior: (A,B) anti-fosfo-tirosina, (C) anti-VEGF R e painel inferior: (A,B) anti-fosfo-tirosina, (C) anti-PDGF R, de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de morfina, DAMGO, VEGF (painel superior) ou PDGF (painel inferior) com MNTX (B em cada painel) ou sem MNTX (A em cada painel).

A Fig. 19 é um painel de manchas imuno indicando fosforilação (ativação) de tirosina do receptor de S1P<sub>3</sub> usando receptor de S1P<sub>3</sub> imunoprecipitado e (A,B) anti-fosfo-tirosina, (C) anti-S1P<sub>3</sub>R, de células endoteliais microvasculares pulmonares humanas na presença de morfina, DAMGO, e S1P com MNTX (B) ou sem MNTX (A).

A Fig. 20 é um gráfico de barras de porcentagem de proliferação acima de controle de células endoteliais microvasculares pulmonares na presença de S1P, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO com siRNA misturado (controle) ou com RhoA siRNA.

A Fig. 21 é um gráfico de barras de porcentagem de

migração acima de controle de células endoteliais microvasculares pulmonares na presença de S1P, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO com siRNA misturado (controle) ou com RhoA siRNA.

A Fig. 22 é um diagrama esquemático resumindo o mecanismo de efeitos de MNTX sobre ativação de RhoA e angiogênese.

#### Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção provê processos de atenuação de anormal ou indesejável migração e/ou proliferação de células endoteliais. Como tal, a invenção provê processos para atenuação de angiogênese em um tecido ou órgão de um sujeito através do uso de antagonistas de opióides, e uma nova abordagem para tratamento de doenças relacionadas angiogênicas e outras doenças hiperproliferativas em mamíferos. Por exemplo, como descrito acima, tumores sólidos baseiam-se na geração de novos vasos sanguíneos para nutrientes atingirem as células dentro de tumor. Os fatores de crescimento requeridos para angiogênese podem ser produzidos pelas células de tumores ou alternativamente, fatores exógenos, como opióides podem estimular crescimento de novo vaso sanguíneo. A presente invenção através do uso de antagonistas de opióides provê uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de tais tumores, onde a geração de novos vasos sanguíneos dentro do tumor, antes que as próprias células de tumor, é o alvo. Este tratamento não é provável conduzir ao desenvolvimento de células de tumor resistentes.

São aqui descritos antagonistas de opióides que inibem proliferação e migração de células endoteliais indu-

zidas por opióides, endógenos ou exógenos, e fatores de crescimento, como VEGF, PDGF, S1P, etc. Antagonistas de opióides periféricos, em particular, mostraram uma substancial eficácia em inibição de proliferação e migração de células endoteliais induzidas por fator de crescimento e opióide. O antagonista de opióide periférico metil naltrexona (MNTX) inibiu ambas proliferação e migração induzidas por fator de crescimento e opióide em uma maneira dependente de concentração. Em adição, naloxona também inibiu migração endotelial induzida por opióide. Deve ser notado, entretanto, que a inibição de naloxona de DAMGO induziu migração de células endoteliais ocorrida em uma concentração micromolar, relativamente alta, de naloxona. Além disso, foi agora verificado que antagonistas de opióides, e o antagonista de opióide periférico MNTX em particular, inibe proliferação e migração de células endoteliais (EC) induzidas por agonista via inibição de receptor de fosforilação e/ou transativação e subsequente inibição de ativação de RhoA. Os agonistas podem ser opióides, exógenos e/ou endógenos, fatores angiogênicos (VEGF), e outros fatores de estimulação de proliferação e/ou migração (PDGF, S1P, receptor de  $AlP_3$ , RhoA, etc.). Estes resultados sugerem que inibição de angiogênese por antagonistas de opióides pode ser uma intervenção terapêutica útil para, entre outros distúrbios, câncer.

Antes de quaisquer realizações da invenção serem explicadas em detalhes, é para ser entendido que a invenção não é limitada em sua aplicação aos detalhes da estrutura e função da invenção mostrada na seguinte descrição ou ilus-

trada nas figuras apostas do desenho. A invenção é capaz de outras realizações e de ser praticada ou realizada em várias maneiras. Também, é para ser entendido que a fraseologia e terminologia aqui usadas são para o propósito de descrição e não devem ser vistas como limitantes. O uso de termos tais como "incluindo", "compreendendo", ou "tendo" e suas variações é aqui pretendido abranger o item listado a seguir e seus equivalentes assim como itens adicionais.

A menos que de outro modo notado, termos técnicos são usados de acordo com utilização convencional. Como aqui usadas, entretanto, as seguintes definições podem ser úteis no auxílio daqueles praticantes versados em entendimento da invenção.

"Sujeito" refere-se a humanos, cães, gatos, e cavalos.

"Uso de opióide crônico" refere-se a e é caracterizado pela necessidade de níveis substancialmente maiores de opióide para produzir o benefício terapêutico como um resultado de anterior uso de opióide, como é bem conhecido na técnica. Uso crônico de opióide como aqui usado inclui tratamento diário com opióide por uma semana ou mais ou uso intermitente de opióide por pelo menos duas semanas.

"Alquila" refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático que é saturado e que pode ser reto, ramificado ou cíclico tendo de 1 a cerca de 10 átomos de carbono na cadeia, e todas as combinações e sub-combinações de cadeias ali. Grupos alquila exemplares incluem metila, etila, n-propila, isopropila, isobutila, butila, isobutila, sec-butila, t-

butila, pentila, hexila, heptila, octila, nonila e decila.

"Alquila inferior" refere-se a um grupo alquila tendo a cerca de 6 átomos de carbono.

"Alquenila" refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático contendo pelo menos uma ligação dupla carbono - carbono e tendo de 2 a cerca de 10 átomos de carbono na cadeia, e toda as combinações e sub-combinações de cadeias ali. Grupos alquenila exemplares incluem grupos vinila, propenila, butenila, pentenila, hexenila, heptenila, octenila, nonenila, e decenila.

"Alquinila" refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático contendo pelo menos uma ligação tripla carbono - carbono e tendo de 2 a cerca de 10 átomos de carbono na cadeia, e combinações e sub-combinações de cadeias ali. Grupos alquinila exemplares incluem grupos etinila, propenila, butenila, pentenila, hexenila, heptenila, octenila, nonenila, e decenila.

"Alquilenos" refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático bivalente tendo de 1 a cerca de 6 átomos de carbono, e todas as combinações e sub-combinações de cadeias ali. O grupo alquilenos pode ser reto, ramificado ou cíclico. Pode existir opcionalmente inseridos junto com o grupo alquilenos um ou mais átomos de oxigênio, enxofre ou nitrogênio opcionalmente substituídos, onde o substituinte de nitrogênio é alquila como descrito anteriormente.

"Alquenilenos" refere-se a um grupo alquilenos contendo pelo menos uma ligação dupla carbono - carbono. Grupos alquenilenos exemplares incluem etenileno ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ) e prope-

nileno ( $\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ ).

"Ciclo alquila" refere-se a qualquer anel monocíclico ou bicíclico estável tendo de cerca de 3 a cerca de 10 carbonos, e todas as combinações e sub-combinações de anéis ali. O grupo cicloalquila pode estar opcionalmente substituído com um ou mais substituintes grupo ciclo alquila. Grupos ciclo alquila exemplares incluem grupos ciclo propila, ciclo butila, ciclo pentila, ciclo hexila, ciclo heptila, e ciclo octila.

10 "Alquila substituído com ciclo alquila" refere-se a um grupo alquila linear, preferivelmente um grupo alquila inferior, substituído em um carbono terminal com um grupo ciclo alquila, preferivelmente um grupo  $\text{C}_{3-8}$  ciclo alquila. Grupos alquila substituídos com ciclo alquila exemplares incluem ciclo hexil metila, ciclo hexil etila, ciclo pentil etila, ciclo pentil propila, ciclo propil metila e semelhantes.

"Ciclo alquenila" refere-se a um grupo ciclo alifático olefinicamente insaturado tendo de cerca de 4 a cerca de 10 carbonos, e todas as combinações e sub-combinações de anéis ali.

"Alcoxi" refere-se a um grupo alquil-O- onde alquila é como descrito anteriormente. Grupos alcoxi exemplares incluem, por exemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi e heptoxi.

"Alcoxi alquila" refere-se a grupo alquil-O-alquila onde alquila é como descrito anteriormente.

"Acila" significa um grupo alquil-CO onde alquila



é como descrito anteriormente. Grupos acila exemplares incluem acetila, propanoíla, 2-metil propanoíla, butanoíla e palmitoíla.

5 "Arila" refere-se a um radical carbocíclico aromático contendo de cerca de 6 a cerca de 10 carbonos, e todas as combinações e sub-combinações de anéis ali. O grupo arila pode estar opcionalmente substituído com um ou dois ou mais substituintes grupo arila. Grupos arila exemplares incluem fenila e naftila.

10 "Alquila substituído com arila" refere-se a um grupo alquila linear, preferivelmente um grupo alquila inferior, substituído em um carbono terminal com um grupo arila opcionalmente substituído, preferivelmente um anel fenil opcionalmente substituído. Grupos alquila substituídos com a-  
15 rila exemplares incluem, por exemplo, fenil metila, fenil etila e 3-(4-metil fenil) propila.

"Heterocíclico" refere-se a radical carbocíclico de sistema de anel monocíclico ou multicíclico contendo de cerca de 4 a cerca de 10 membros, e todas as combinações e  
20 sub-combinações de anéis ali, onde um ou mais dos membros do anel é um elemento outro que não carbono, por exemplo, nitrogênio, oxigênio ou enxofre. O grupo heterocíclico pode ser aromático ou não-aromático. Grupos heterocíclicos exemplares incluem, por exemplo, grupos pirrol e piperidina.

25 "Halo" refere-se a flúor, cloro, bromo ou iodo.

"Periférico", em referência a antagonistas de opióides, designa antagonistas de opióides que atuam primariamente sobre sistemas fisiológicos e componentes externos ao

sistema nervoso central, por exemplo, eles não cruzam facilmente a barreira sangue - cérebro em uma quantidade efetiva para inibir os efeitos centrais de opióides. Em outras palavras, antagonistas de opióides periféricos não inibem efetivamente os efeitos analgésicos de opióides quando administrados perifericamente, por exemplo, eles não reduzem o efeito analgésico dos opióides. Por exemplo, os compostos antagonistas de opióides periféricos empregados nos processos da presente invenção exibem altos níveis de atividade com relação a tecido gastrointestinal, enquanto exibindo reduzida ou substancialmente nenhuma atividade sobre sistema nervoso central (SNC). Os compostos antagonistas de opióides periféricos empregados nos presentes processos apropriadamente exibem menos que cerca de 5-15% de sua atividade farmacológica no CNS, com cerca de 0% (por exemplo, nenhuma atividade em CNS) sendo mais apropriado. A característica de atuação não-central de um antagonista de opióide periférico é freqüentemente relacionada a carga, polaridade e/ou tamanho da molécula. Por exemplo, antagonistas de opióides amina quaternária atuando perifericamente são carregados positivamente enquanto os antagonistas de opióides amina terciária de atuação central são moléculas neutras. Os antagonistas de opióides periféricos úteis na presente invenção são tipicamente antagonistas de opióides  $\mu$  e/ou  $\kappa$ .

25           Como aqui usado, "anti-angiogênese" ou "anti-angiogênico" é pretendido referir-se à capacidade de uma molécula / composto para atenuar, por exemplo, inibir, reduzir ou modular, proliferação de novos vasos sanguíneos, em ge-

ral, e por exemplo, para reduzir ou inibir migração e proliferação de células endoteliais microvasculares humanas em cultura na presença de certos fatores de crescimento. Como descrito acima, a formação de novos vasos sanguíneos por células endoteliais envolve migração, proliferação e diferenciação das células.

Na seguinte descrição dos processos da invenção, etapas de processo são realizadas em temperatura ambiente e pressão atmosférica a menos que de outro modo especificado.

10 É também especificamente entendido que qualquer faixa numérica aqui recitada inclui todos os valores a partir de valor inferior até o valor superior, por exemplo, todas as possíveis combinações de valores numéricos entre o valor mais baixo e o valor mais alto enumerados são para serem considerados serem expressamente estabelecido neste pedido de pa-

15 tente. Por exemplo, se uma faixa de concentrações ou faixa de efeito benéfico é estabelecida como 1% a 50%, é pretendido que valores tais como 2% a 40%, 10% a 30%, ou 1% a 3%, etc., são expressamente enumerados neste relatório descritivo.

20 Estes são somente exemplos do que é especificamente pretendido.

Em um aspecto, a presente invenção refere-se a processos de atenuação de anormal ou indesejável migração e/ou proliferação celular, particularmente endotelial, e angiogênese em tecido ou um órgão de um sujeito. Os processos compreendem provimento ou administração de um ou mais antagonistas de opióides em uma quantidade efetiva a células endoteliais do tecido ou órgão de um paciente para inibir mi-

25

gração e proliferação de células endoteliais, e angiogênese. A angiogênese pode, em parte, ser o resultado de recebimento de tratamento com opióide, particularmente para gerenciamento de dor em pacientes de câncer, ou tendo altos níveis de opióides endógenos.

Foi observado que morfina e o agonista  $\mu$  de encefalina DAMGO([D-Ala<sup>2</sup>, N-McPhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol] encefalina), cada uma causa um aumento dependente de dose em migração de células endoteliais similar àquele de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como medido por, por exemplo, um ensaio de quimiotaxia (como detalhado nos exemplos abaixo) ou outros ensaios similares usados para identificação de fatores em angiogênese de tumor e as drogas que afetam os mesmos. Em concentrações clinicamente relevantes de morfina, a magnitude do efeito é aproximadamente 70% daquele que é obtido por VEGF. Esta migração de células endoteliais baseada em morfina é atenuada pelo antagonista de opióide  $\mu$  metil naltrexona (MNTX) em uma maneira dependente de dose. Por exemplo, migração de células endoteliais induzida por morfina, em concentrações tão baixas como  $10^{-7}$ M, é significativamente bloqueada por MNTX  $10^{-7}$ M (Fig. 2). Esta atenuação sugerindo fortemente que migração de células endoteliais é mediada por ação de morfina sobre o receptor de opióide  $\mu$  (MOR). Como descrito nos exemplos abaixo, o efeito via o MOR antes que outros receptores de opióide é confirmado através de experimentos que mostram que o agonista  $\mu$  encefalina sintética altamente seletivo DAMGO também induz migração. O efeito migratório induzido por DAMGO é também bloqueado por MNTX

(Fig. 3).

Em uma revisão abrangente (Neumann et al. Pain 1982; 13:247-52), analgesia em pacientes de câncer foi associada com uma faixa de concentrações de estado estável de morfina em plasma variando de 6 a 364 ng/mL. Foi observado que um efeito de morfina que causa migração de células endoteliais em 100 ng/mL bem dentro de faixa de dose clínica. Por isso é acreditado pelos presentes inventores que uma dose de MNTX que manterá níveis em plasma de MNTX em níveis mínimos de MNTX em plasma entre cerca de 25 e 150 ng/mL podem ser apropriados. Tais doses são obtíveis e são bem toleradas (Yuan et al., J Clin Pharmacol 2005;45:538-46).

Alvimopan, um outro antagonista de opióide periférico seletivo dado oralmente, está no estágio final de desenvolvimento para profilaxia de ileus pós-operatório e o gerenciamento de constipação induzida por opióide (Moss et al., Pain relief without side effects: peripheral opioid antagonists. In Schwartz, A.J., editor. 33<sup>rd</sup> ASA Refresher Course in Anesthesiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (na prensa)). Existe alguma transposição de alvimopan através de membrana (J. Foss, et al., Clin. Pharm. & Ther. 2005, PII-90, p. 74) e ele pode, por isso, possuir a habilidade para reverter alguns dos efeitos sistêmicos de opióides sem afetar analgesia mesmo quando dado oralmente.

Sem ser preso a qualquer particular teoria, pode ser que o mecanismo de efeito de opióide mu sobre migração de células endoteliais ocorra no nível de membrana na medida em que MNTX, diferente de naloxona, é uma molécula carregada

em pH fisiológico. Morfina atua via receptores acoplados a proteína-G, enquanto VEGF atua através de receptor de tirosina cinases. Embora as ações de agonistas  $\mu$  e VEGF possam ser independentes, há uma crescente evidência de transativação de receptor como um mecanismo. Uma investigação anterior demonstrou que toxina pertussis dependente de GPCRs transativa receptor de VEGF - 2/FlK1 (Zeng, H. et al., J. Biol. Chem. 2003; 278:20738-45). Desta maneira morfina pode transativar Fl1c-1 e promover um ambiente onde proliferação de células endoteliais e crescimento de tumor podem ocorrer. Um recente estudo de camundongos nocaute MOR infectados com células de fibrosarcoma T241 demonstrou significantes diferenças nas incidências de crescimento de tumor e um aumento de 10 vezes em expressão de Fl1 c-1 em camundongos tratados com morfina versus controles, versus nenhum aumento em camundongos KO tratados com morfina (K. Gupta, comunicação pessoal). Isto ainda provê evidência de que morfina estimula proliferação de células endoteliais e promove crescimento de tumor provavelmente através de transativação de fosforilação de FLK1. Como tal, a presente invenção provê potenciais estratégias clínicas usando MNTX assim como outros antagonistas de opióides periféricos em conjunção com terapias correntes alvejando VEGF. Embora um efeito direto através de transativação de receptor seja possível, um potencial fator adicional envolvido na proliferação de tumores pode bem ser o papel de quimiocinas como integradoras de dor e inflamação. Uma recente revisão sobre este objeto (White et al., Nature Ver. Drug Discovery 2005; 4:834-44) também sugere um possí-

vel papel para leucócitos em ativação de receptores de opi-  
óides.

Além disso, foi observado que morfina, DAMGO, e VEGF estimulam ativação de RhoA que é inibida por antagonis-  
5 tas de opióides, como MNTX. RhoA é uma importante molécula  
sinalizante envolvida em angiogênese (Aepfelbacher et al.,  
1997; Cascone et al., 2003; Hoang et al., 2004; Liu and San-  
ger, 2004). Transativação de receptor de VEGF é importante  
para ativação de RhoA induzida por opiato. Silenciamento de  
10 expressão de RhoA bloqueou proliferação e migração de EC in-  
duzidas por VEGF e opióide, demonstrando um papel para ati-  
vação de RhoA em atividade angiogênica EC induzida por ago-  
nista. A atenuação mediada por MNTX de ativação de RhoA pode  
ser importante para o papel inibidor de MNTX sobre angiogê-  
15 nese induzida por VEGF e opióide.

Devido morfina e outros opióides em doses clínicas  
aperfeiçoarem migração de células endoteliais, a presente  
invenção pode ser de valor terapêutico em tratamento com an-  
tagonista de opióide para pacientes sobre significantes e  
20 sustentadas doses de opióides que têm tumores se baseando no  
processo angiogênico. Ainda, embora as observações clínicas  
do inventor tenham focalizado sobre morfina, que é adminis-  
trada exogenamente, opióides endógenos, que são liberados  
através de tensão ou dor, também podem desempenha um papel  
25 em migração de célula endotelial. Baseado em experimentos de  
migração de células endoteliais detalhados abaixo nos exem-  
plos, MNTX e antagonistas de opióides são genericamente de  
valor terapêutico como uma terapia angiogênica mesmo ausente

administração de opióide exógeno (como aqui detalhada). É imaginado que os processos da presente invenção inibirão ou reduzirão o crescimento de vasos sanguíneos dentro e para um tumor. Inibição de crescimento de vasos sanguíneos dentro de  
5 tumores evita nutrientes e oxigênio serem supridos para o tumor para suporte de crescimento além de um certo tamanho. Minimização de número de vasos sanguíneos ou outros tumores também diminui a probabilidade de que o tumor sofra metástase.

10 A presente invenção pode ser de valor terapêutico em tratamento de antagonista de opióide para pacientes que têm tumores se baseando no processo angiogênico. Tumores que se baseiam em processos angiogênicos são tumores sólidos, leucemias e mielomas. Tumores sólidos incluem, mas não são  
15 limitados a carcinoma cortical adrenal, tumores da bexiga; carcinoma de célula escamosa, carcinomas uroteliais; tumores do osso; adamantinoma, cistos de osso aneurismais, condroblastoma, condroma, fibroma condromixóide, condrosarcoma, displasia fibrosa do osso, tumor de célula gigante, osteocondroma, osteosarcoma; tumores de mama; carcinoma de duto  
20 secretor, cordoma; tumores de cólon: adenocarcinoma colorretal; tumores dos olhos: melanoma uveal posterior, fibrogênese imperfecta ossium, carcinoma de célula escamosa de pescoço e cabeça; tumores dos rins: carcinoma de célula renal cromofóbica, carcinoma de célula renal clara, nefroblastoma  
25 (tumor Wilms), rim: carcinoma de célula renal papilar, tumor ASPSCR1-TFE3 renal primário, carcinoma de célula renal; tumores de fígado: hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular;



tumores de pulmão : carcinoma de célula não-pequena, câncer de célula pequena; melanoma maligno de partes moles; tumores de sistema nervoso; meduloblastoma, meningioma, neuroblastoma, tumores astrocíticos, ependimomas, tumores de bainha de nervo periférico, feocromocitoma; tumores de ovário: tumores epiteliais, tumores de célula germe, tumores estromais - cordão de sexo, pericitoma; adenomas de pituitária; tumor rabdóide; tumores de pele; histiocitomas fibrosos benignos cutâneos; tumores de músculo liso; leiomiomatose intravenosa; tumores de tecido macio; liposarcoma, liposarcoma mixóide, sarcoma fibromixóide de baixo grau, leiomiosarcoma, sarcoma de parte macia alveolar, histiocitoma fibroso angioma-tóide (AFH), sarcoma de célula clara, tumor de célula redonda pequena desmoplástica, elastofibroma, tumores de Ewing, condrosarcoma mixóide extra-esqueleto, tumor miofibroblástico inflamatório, lipoblastoma, tumores lipomatosos benignos / lipoma, tumores lipomatosos malignos / liposarcoma, mioepitelioma maligno, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial, câncer de célula escamosa; tumores dos testículos: tumores de células germes, seminoma espermatocítico; tumores de tiróide: carcinoma anaplástico (não-diferenciado), tumores oncocíticos, carcinoma papilar; tumores de útero: carcinoma e cérvix, carcinoma endometrial, leiomioma, etc.

Em uma realização da invenção os tumores são câncer de próstata, tumores gastrointestinais como câncer de colo ou pancreático e os compostos da invenção são coadministrados com outros agentes anticâncer como aqui descritos.

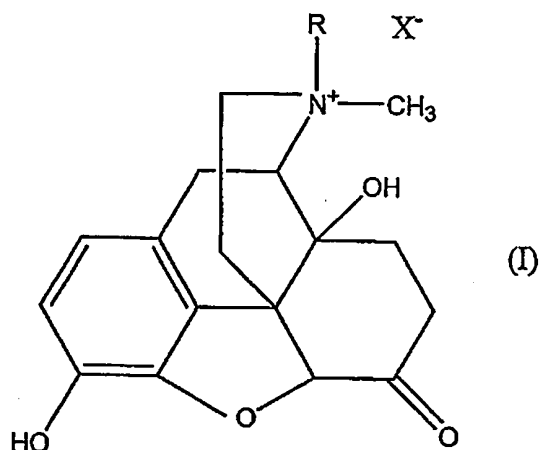
Os antagonistas de opióides de acordo com a pre-

sente invenção incluem ambos, antagonistas de opióides atuando centralmente e periféricamente. É contemplado que aqueles antagonistas de particular valor são apropriadamente os antagonistas de opióides periféricos. Especialmente apropriado pode ser um antagonista de opióide mu, especialmente um antagonista de opióide periférico mu. Antagonistas de opióides formam uma classe de compostos que pode variar em estrutura enquanto mantendo a propriedade restritiva periférica. Estes compostos incluem morfinans terciários e quaternários, em particular derivados de noroximorfona, piperidinas N-substituídas, e em particular, N-alquil carboxilatos de piperidina, e 20 benzomorfanos terciários e quaternários. Antagonistas periféricamente restritos, enquanto variados em estrutura, são tipicamente carregados, polares e/ou de alto peso molecular, cada um dos quais impede seu cruzamento da barreira de sangue - cérebro.

Exemplos de antagonistas de opióides, que cruzam a barreira de sangue - cérebro e são centralmente ativos (e periféricamente), incluem, por exemplo, naloxona, naltrexona (cada um dos quais é comercialmente disponível de Baxter Pharmaceutical Products, Inc.) e nalmefene (disponível de, por exemplo, DuPont Pharma). Estes podem ser de valor na atenuação de angiogênese no sistema nervoso central ou em pacientes não sendo tratados para gerenciamento de dor ou outro tratamento opióide.

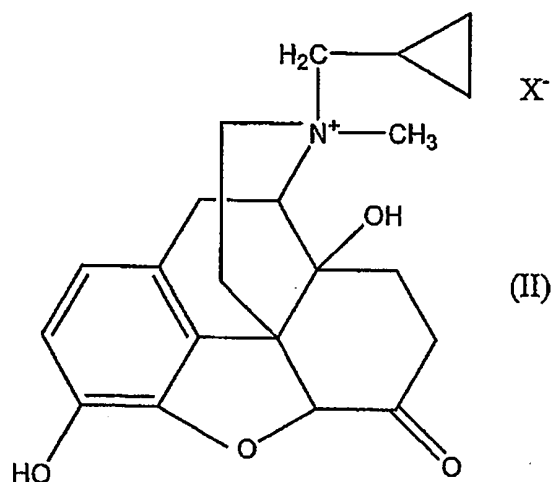
Um antagonista de opióide periférico útil para a presente invenção pode ser um composto que é um derivado de morfinam quaternário, e em particular, um noroxi morfona

quaternário de fórmula (I):



onde R é alquila, alquenila, alquinila, arila, alquila substituído com ciclo alquila ou alquila substituído com arila, e X' é o na ion, especialmente um anion cloreto, brometo, iodeto ou metil sulfato. Os derivados de noroxi morfona de fórmula (I) podem ser preparados, por exemplo, de acordo com o procedimento na patente US 4 176 186, que é aqui incorporada por referência; ver também, patentes US 4 719 215; 4 861 781; 5 102 887; 5 972 954 e 6 274 591; pedidos de patente US 2002/0028825 e 2003/0022909; e publicações PCT WO 99/22737 e WO 98/25613, todas as quais são aqui incorporadas por referência.

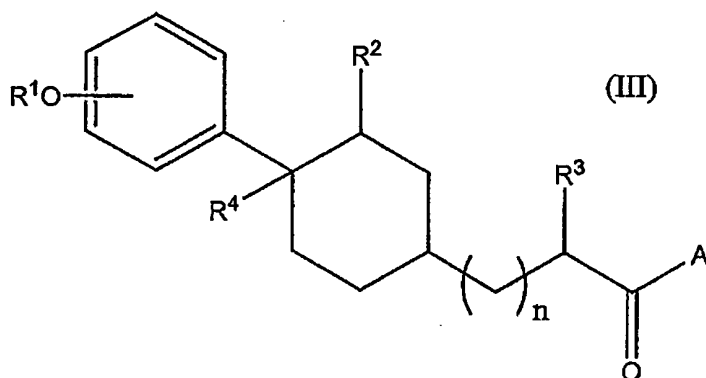
Um composto de fórmula (I) de particular valor é N-metil naltrexona (ou simplesmente metil naltrexona), onde R é ciclo propil metila como representado na fórmula (II):



onde X' é como descrito acima. Metil naltrexona é um derivado quaternário do antagonista de opióide naltrexona. Metil naltrexona existe como um sal, e "metil naltrexona" ou "MNTX", como aqui usado, por isso abrange sais. "Metil naltrexona" ou "MNTX" especificamente inclui, mas não é limitado a, sais brometo, sais cloreto, sais iodeto, sais carbonato, e sais sulfato de metil naltrexona. Nomes usados para o sal brometo de MNTX na literatura incluem: brometo de metil naltrexona; brometo de N-metil naltrexona; metobrometo de naltrexona; metil brometo de naltrexona; SC-37359, MRZ-2663-BR, e metobrometo de N-ciclo propil metil noroxi morfina. Metil naltrexona é comercialmente disponível de , por exemplo, Mallinckrodt Pharmaceuticals, St. Louis, Mo. Metil naltrexona é provida como um pulverizado cristalino branco, livremente solúvel em água, tipicamente com o sal brometo. O composto como provido é 99,4% puro por HPLC de fase reversa, e contem menos que 0,011% de naltrexona não-quaternizada através do mesmo processo. Metil naltrexona pode ser preparada como uma solução estéril em uma concentração de, por e-

xemplo, cerca de 5 mg/mL.

Outros apropriados antagonistas de opióides periféricos podem incluir piperidinas N-substituídas, e em particular, N-alkuil carboxilatos de piperidina como representados pela fórmula (III):



onde

R¹ é hidrogênio ou alquila;

R² é hidrogênio, alquila, ou alquenila;

R³ é hidrogênio, alquila, alquenila, arila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquenila ou alquila substituído com arila;

R⁴ é hidrogênio, alquila, ou alquenila;

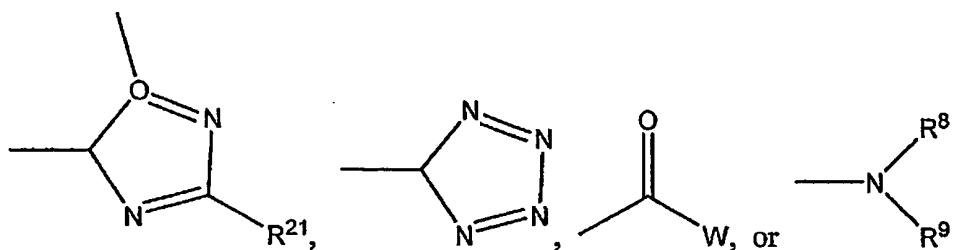
A é OR⁵ ou NR⁶R⁷; onde

R⁵ é hidrogênio, alquila, alquenila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquenila ou alquila substituído com arila;

R⁶ é hidrogênio ou alquila;

$R^7$  é hidrogênio, alquila, alquenila, arila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquenila ou alquila substituído com arila, ou B substituído com alquilenos ou  
 5 junto com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados,  $R^6$  e  $R^7$  formam um anel heterocíclico selecionado de pirrol e piperidina;

B é



onde  $R^8$  é hidrogênio ou alquila;

$R^9$  é hidrogênio, alquila, alquenila, arila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquenila, ou alquila substituído com arila ou junto com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados,  $R^8$  e  $R^9$  formam um anel heterocíclico selecionado de pirrol e piperidina;  
 15

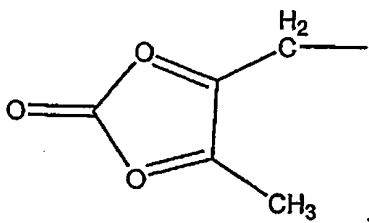
$W$  é  $OR^{10}$ ,  $NR^{11}R^{12}$ , ou  $OE$ ; onde

$R^{10}$  é hidrogênio, alquila, alquenila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquenila substituído com ciclo alquenila, ou alquila substituído com arila;  
 20

$R^{11}$  é hidrogênio ou alquila;

$R^{12}$  é hidrogênio, alquila, alquenila, arila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquenila, alquila substituído com arila ou  $C(=O)Y$  substituído com alquileno ou, junto com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados,  $R^{11}$  e  $R^{12}$  formam um anel heterocíclico selecionado de pirrol e piperidina;

E é



$(C=O)D$  substituído com alquileno ou  $-R^{13}OC(=O)R^{14}$ ;  
10 onde

$R^{13}$  é alquileno substituído com alquila;

$R^{14}$  é alquila;

D é  $OR^{15}$  ou  $NR^{16}R^{17}$ ; onde

$R^{15}$  é hidrogênio, alquila, alquenila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquenila, ou alquila substituído com arila;

$R^{16}$  é hidrogênio, alquila, alquenila, arila, alquila substituído com arila, ciclo alquila, ciclo alquenila, alquila substituído com ciclo alquila, ou alquila substituído com ciclo alquenila;

$R^{17}$  é hidrogênio ou alquila ou, junto com o átomo

de nitrogênio ao qual eles estão ligados,  $R^{16}$  e  $R^{17}$  formam um anel heterocíclico selecionado do grupo consistindo em pirrol ou piperidina;

Y é  $OR^{18}$  ou  $NR^{19}R^{20}$ ; onde

5  $R^{18}$  é hidrogênio, alquila, alquênica, ciclo alquila, ciclo alquênica, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquênica, ou alquila substituído com arila;

$R^{19}$  é hidrogênio ou alquila;

10  $R^{20}$  é hidrogênio, alquila, alquênica, arila, ciclo alquila, ciclo alquênica, alquila substituído com ciclo alquila, alquila substituído com ciclo alquênica, ou alquila substituído com arila ou, juntos com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados,  $R^{19}$  e  $R^{20}$  formam um anel heterocíclico selecionado de pirrol e piperidina;

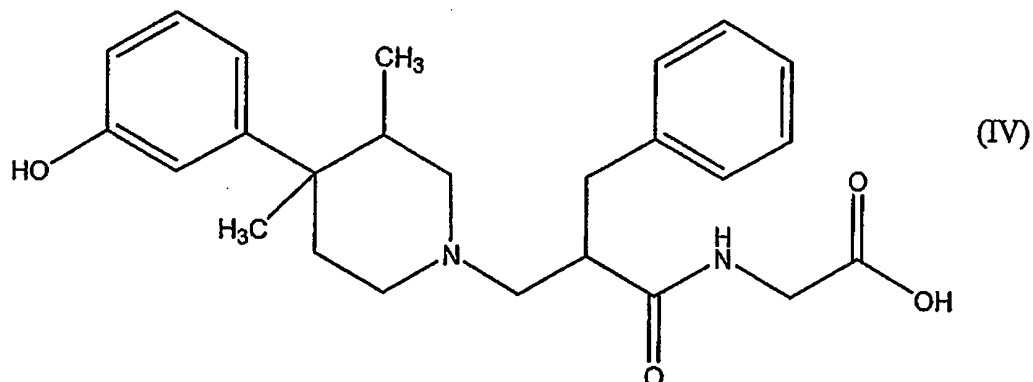
$R^{21}$  é hidrogênio ou alquila;

e n é 0 a 4.

Particulares N-alquil carbonilatos de piperidina que podem ser de valor são piperidinas N-alquil amino-3,4,4-substituídas, como alvimopan representado abaixo como fórmula (IV):

20



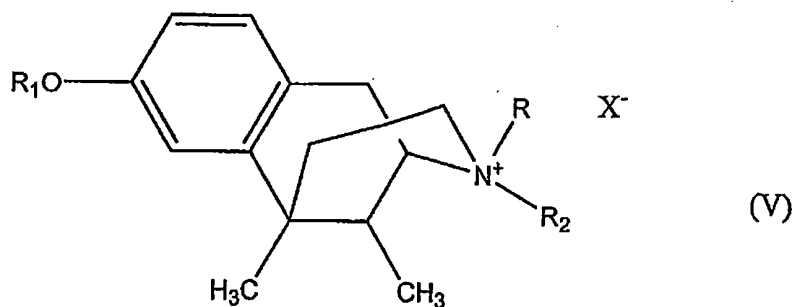


Apropriadas piperidinas N-substituídas podem ser preparadas como mostrado nas patentes US 5 270 328; 6 451 806; 6 469 030, todas as quais são aqui incorporadas por referência. Alvimopan é disponível de Adolor Corp., Exton, PA.

5 Tais compostos têm pesos moleculares moderadamente altos, uma forma zwitteriônica e uma polaridade que evita penetração da barreira de sangue - cérebro.

Ainda outros compostos antagonistas de opióides periféricos apropriados podem incluir compostos benzomorfan quaternários. Os compostos benzomorfan quaternários empregados nos processos da presente invenção exibem altos níveis de antagonismo de morfina, enquanto exibindo reduzida, e preferivelmente substancialmente nenhuma, atividade agonis-  
ta.

15 Os compostos benzomorfan quaternários que podem ser empregados nos processos da presente invenção têm a seguinte fórmula (V):



onde;

$R^1$  é hidrogênio, acila ou acetoxi; e

$R^2$  é alquila ou alquenila;

R é alquila, alquenila ou alqueinila

e

$X'$  é um anion, especialmente um anion cloreto, brometo, iodeto, ou metil sulfato.

Específicos derivados quaternários de compostos benzomorfan que podem ser empregados nos processos da presente invenção incluem os seguintes compostos de fórmula (V): brometo de 2'-hidroxi-5,9-dimetil-2,2-dialil-6,7-benzomorfanium; brometo de 2'-hidroxi-5,9-dimetil-2-n-propil-2-alil-6,7-benzomorfanium; brometo de 2'-hidroxi-5,9-dimetil-2-n-propil-2-propargil-6,7-benzomorfanium; e brometo de 2'-acetoxi-5,9-dimetil-2-n-propil-2-alil-6,7-benzomorfanium.

Outros compostos benzomorfan quaternários que podem ser empregados nos processos da presente invenção são descritos, por exemplo, na patente US 3 723 440, a inteira exposição da qual é aqui incorporada por referência.

Os compostos empregados nos processos da presente invenção podem existir em forma de pró-droga. Como aqui usa-

do, "pró-droga" é pretendido incluir quaisquer carreadores ligados covalentemente que liberam a droga parente ativa de acordo com fórmulas (I) a (V) ou outras fórmulas ou compostos empregados nos processos da presente invenção in vivo quando tal pró-droga é administrada a um sujeito mamífero. Desde que pró-drogas são conhecidas aperfeiçoarem numerosas qualidades desejáveis de compostos farmacêuticos (por exemplo, solubilidade, biodisponibilidade, fabricação, etc.), os compostos empregados nos presentes processos podem, se desejado, ser liberados em forma de pró-droga. Assim, a presente invenção contempla processos de liberação de pró-drogas. Pró-drogas dos compostos empregados na presente invenção podem ser preparadas através de modificação de grupos funcionais presentes no composto de modo que as modificações sejam clivadas, tanto em manipulação de rotina como in vivo, para o composto parente.

Da mesma maneira, pró-drogas incluem, por exemplo, compostos aqui descritos nos quais um grupo hidroxí, amino ou carboxi está ligado a qualquer grupo que, quando a pró-droga é administrada a um sujeito mamífero, cliva para formar uma hidroxila livre, amino livre, ou ácido carboxílico, respectivamente.

Exemplos incluem, mas não são limitados a, derivados acetato, formato e benzoato de grupos funcionais álcool e amina; e alquil, carboxílico, aril, e alquil aril ésteres tais como metil, etil, propil, isopropil, butil, isobutil, s-butil, t-butil, ciclo propil, fenil, benzil e fenetil ésteres, e semelhantes.

Como notado, os compostos empregados nos processos da presente invenção podem ser preparados em um número de maneiras bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Todas as preparações mostradas em associação com a presente  
5 invenção são contempladas serem praticadas em qualquer escala, incluindo miligrama, grama, multigrama, quilograma, multiquilograma, ou escala farmacêutica comercial.

Compostos empregados nos presentes processos podem conter um ou mais átomos de carbono substituídos assimetricamente, e podem ser isolados em forma opticamente ativa ou  
10 racêmica. Assim, todas as formas, quiral, diastereomérica, racêmica, epimérica e todas as formas isoméricas geométricas de uma estrutura são pretendidas, a menos que a específica estereoquímica ou forma isomérica seja especificamente identificada. É bem conhecido na técnica preparar e isolar tais  
15 formas opticamente ativas. Por exemplo, misturas de estereoisômeros podem ser separadas através de técnicas padrões incluindo, mas não limitadas a, resolução de forma racêmica, cromatografia normal, fase - reversa, e quiral, formação de  
20 sal preferencial, recristalização, e semelhantes, ou através de síntese quiral tanto a partir de materiais de partida quirais como através de síntese deliberada de centros quirais alvos.

Em algumas realizações da invenção, o antagonista  
25 de opióide pode ser um antagonista de opióide  $\mu$ . Em outras realizações, o antagonista de opióide pode ser um antagonista de opióide  $\kappa$ . A invenção também abrange administração de mais de um antagonista de opióide, incluindo combinações

de antagonistas mu, combinações de antagonistas kapa e combinações de antagonistas mu e kapa, por exemplo, uma combinação de metil naltrexona e alvimopan.

Os processos da presente invenção abrangem provi-  
5 mento de um papel terapêutico ou profilático em outras doenças baseadas em endoteliais, por exemplo, em uma variedade de doenças não-neoplásticas e neoplásticas relacionadas com proliferação e/ou angiogênese, por exemplo, doença de célula foice, doença neovascular do olho tal como retinopatia diabética, glaucoma neovascular, retinopatia de prematuridade, degeneração macular relacionada com idade), proliferação endotelial nos rins ou pulmões e psoríase. Condições não-neoplásticas que são suscetíveis a tratamento incluem artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose, retinopatias diabéticas e outras proliferativas incluindo retinopatia de pre-  
10 maturidade, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneração macular relacionada com idade, hiperplasias de tiróide (incluindo doença de Grave), transplante de córnea e outro tecido, inflamação crônica, inflamação de pulmão, síndrome nefrótica, pré-eclâmpsia, ascite, efusão pericardial (tal como aquela associada com pericardite), e efusão pleural. Por exemplo, foi mostrado que morfina induziu retinopatia proliferativa em doença de célula foice (Gupta et al., comunicação pessoal). É antecipado que tratamento com um an-  
15 tagonista de opióide pode inibir significativamente a retinopatia, particularmente com retinopatia induzida por opióide em pacientes de célula foice que estão em terapia com opióide ativa, e recebem opióides por longos períodos de tempo,

incluindo terapia crônica por semanas, meses ou mesmo anos.

Os processos da presente invenção também são imaginados serem de valor em redução de risco de recorrência de uma malignidade ou neoplasma após tratamento com outras modalidades terapêuticas, por exemplo, após intervenção cirúrgica. Por exemplo, a presente invenção provê um processo para redução de risco de recorrência de câncer pós-operatório. Os cânceres podem incluir, por exemplo, câncer de mama ou câncer de próstata, e reduzido risco pode ser obtido através de provimento para o paciente sofrendo de tal câncer de uma quantidade de um antagonista de opióide, particularmente um antagonista de opióide periférico. Por exemplo, como descrito acima, pacientes sofrendo cirurgia de câncer de mama tiveram uma significativa diferença (quatro vezes) na incidência de recorrência em 2-4 anos dependendo de se os pacientes receberam anestesia regional ou geral (com morfina durante sua cirurgia inicial). Co-administração dos antagonistas de opióides, especialmente antagonista periférico, de acordo com a presente invenção com tratamento cirúrgico pode ser de valor para reduzir a incidência de recorrência do câncer.

Também é contemplado que a invenção provê um processo de inibição de atividade de VEGF através de provimento para as células afetadas ou sujeito, de uma quantidade de um antagonista opióide sob condições suficientes para inibir angiogênese induzida por VEGF. Em outras palavras, os compostos da presente invenção têm atividade antagonista ou inibidora de VEGF.

Como também mostrado nos exemplos abaixo, foi ain-

da verificado que um antagonista de opióides periférico, MNTX, atenua não somente migração de células endoteliais induzida por VEGF, mas também indução de migração e/ou proliferação endotelial através de outros fatores pró-migração /  
5 pró-proliferativos tais como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), ou esfingosina 1-fosfato (S1P). Tal atenuação varia de cerca de 10% a 60%, e ainda provê evidência de que os processos da presente invenção têm valor em inibição de fatores pró-migração, pró-angiogênicos.

10 Os processos da invenção também abrangem tratamento de pacientes, por exemplo, pacientes de câncer, que estão sofrendo tratamento com agonistas de opióides. Agonistas de opióides incluem, mas não são limitados a, morfina, metadona, codeína, meperidina, fentidina, fentanil, sufentanil,  
15 alfentanil e semelhantes. Como descrito acima, agonistas de opióides são classificados por sua habilidade para agonizar um tipo de receptor uma ordem de magnitude mais efetivamente que um outro. Por exemplo, a afinidade relativa de morfina para o receptor  $\mu$  é 200 vezes maior do que para o receptor  $\kappa$ , e é por isso classificado como um agonista de opióide  
20  $\mu$ . Alguns agonistas de opióides podem atuar como agonistas na direção de um receptor e antagonistas na direção de um outro receptor e são classificados como agonistas / antagonistas (também conhecidos como agonistas mistos ou parciais). "Agonista / antagonista", "agonista parcial", e "agonista misto" são aqui usados intercambiavelmente. Estes opióides incluem, mas não são limitados a, pentazocina, butorfanol, nalorfina, nalbufina, buprenorfina, bremazocina, e  
25

bezocina. Muitos do grupo agonista / antagonista de opióides são agonistas nos receptores kapa e antagonistas nos receptores mu. Ainda, é imaginado que os metabólitos ativos de agonistas de opióides também podem ser ativos como indutores de angiogênese. Por exemplo, os metabólitos de morfina, morfina 3-glicuronídeo (M3G) e morfina 6-glicuronídeo (M6G) podem ser fatores pró-angiogênicos ativos.

Genericamente, os antagonistas de opióides periféricos de acordo com a presente invenção podem ser administrados em uma quantidade efetiva de modo que o nível em plasma do paciente do antagonista de opióide periférico está na faixa de  $10^{-6}$  M a  $10^{-9}$  M. Níveis de droga em plasma de paciente podem ser medidos usando processos de HPLC rotineiros conhecidos por aqueles versados na técnica.

Como descrito nos exemplos abaixo, o análogo de encefalina DAMGO induz migração endotelial. Assim, os processos da presente invenção podem ser de valor para paciente sofrendo de doenças relacionadas com angiogênese ou hiperproliferativas, por exemplo, câncer, bem à parte de tratamento com agonistas de opióides.

O particular modo de administração do antagonista de opióide selecionado dependerá, é claro, da particular combinação de drogas selecionada, a seriedade da progressão de tumor sendo tratado, no paciente de câncer, a condição geral de saúde do paciente, e a dosagem requerida para eficácia terapêutica. Os processos desta invenção, falando genericamente, podem ser praticados usando qualquer modo de administração que seja medicamente aceitável, por exemplo,



qualquer modo que produza níveis efetivos dos compostos ativos sem causar efeitos adversos clinicamente inaceitáveis. Tais modos de administração incluem oral, retal, tópica (como através de pulverizado, unguento, gotas, emplastro trans-  
5 dérmico ou dispositivo iontoforético), transdérmica, sublingual, intramuscular, infusão, intravenosa, pulmonar, intramuscular, intracavidade, como um aerossol, aural (por exemplo, via gotas de ouvido), intranasal, inalação, intraocular ou subcutânea. Injeção direta também pode ser usada para li-  
10 beração local. Administração oral ou subcutânea pode ser apropriada para tratamento profilático ou de longo termo devido a conveniência do paciente assim como o esquema de dosagem. Para doenças oculares, formulações oftálmicas podem ser injetadas ou instiladas diretamente.

15           Adicionalmente, os antagonistas de opióides podem ser administrados como um comprimido ou cápsula com revestimento entérico. Em algumas realizações, o antagonista de opióide é administrado através de um processo de infusão lenta ou através de um processo de liberação com o tempo ou li-  
20 beração controlada ou como um pulverizado liofilizado.

Quando administrados, os compostos da invenção são dados em quantidades farmacologicamente aceitáveis e em composições ou preparações farmacologicamente aceitáveis. Tais preparações rotineiramente podem conter sais, agentes tampo-  
25 nantes, preservativos, e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos. Quando usados em medicamento, os sais devem ser farmacologicamente aceitáveis, mas sais não-farmacologicamente aceitáveis podem ser convenientemente usa-

dos para preparação de seus sais farmaceuticamente aceitáveis e não são excluídos do escopo da invenção. Tais sais farmacológica e farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados àqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maléico, acético, salicílico, p-tolueno sulfônico, tartárico, cítrico, metano sulfônico, fórmico, succínico, naftaleno-2-sulfônico, pamóico, 3-hidroxi-2-naftaleno carboxílico, e benzeno sulfônico. Apropriados agentes tamponantes incluem, mas não são limitados a, ácido acético e seus sais (1-2% WN); ácido cítrico e seus sais (1-3% WN); ácido bórico e seus sais (0,5-2,5% WN); e ácido fosfórico e seus sais (0,8-2% WN).

Apropriados preservativos incluem, mas não são limitados a, cloreto de benzalcônio (0,003-0,03%, WN); clorobutanol (0,3-0,9% W/N); parabenos (0,01-0,25% WN) e timerosal (0,004-0,02% WN).

Para facilidade de administração, uma composição farmacêutica do antagonista de opióide periférico também pode conter um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis, tais como lubrificantes, diluentes, ligantes, carreadores e desintegrantes. Outros agentes auxiliares podem incluir, por exemplo, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar pressão osmótica, corantes, aromatizante e/ou compostos ativos aromáticos.

Um carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável refere-se a material de enchimento, diluente, material de encapsulação ou auxiliar de formulação sólido, semi - sólido

lido ou líquido de qualquer tipo. Por exemplo, apropriados  
carreadores, diluentes, solventes ou veículos farmaceutica-  
mente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, água, so-  
luções de sais (tampões), álcoois, goma arábica, óleos mine-  
5 rais e vegetais, álcoois benzílicos, polietileno glicóis,  
gelatina, carboidratos como lactose, amilose ou amido, este-  
arato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa,  
óleos vegetais, monoglicerídeos e diglicerídeos de ácido  
graxo, ésteres de ácido graxo de pentaeritritol, hidroxí me-  
10 til celulose, polivinil pirrolidona, etc. Fluidez própria  
pode ser mantida, por exemplo, através do uso de materiais  
de revestimento como lecitina, através de manutenção do re-  
querido tamanho de partícula no caso de dispersões e através  
do uso de tensoativos. Prevenção da ação de microorganismos  
15 pode ser assegurada através de inclusão de vários agentes  
antibacteriais e anti-fungos tais como parabeno, clorobuta-  
nol, fenol, ácido sórbico e semelhantes.

Se um carreador sólido farmaceuticamente aceitável  
é usado, a forma de dosagem dos análogos pode ser comprimi-  
20 dos, cápsulas, pulverizados, supositórios, ou losangos. Se  
um carreador líquido é usado, cápsulas moles de gelatina,  
emplastros transdérmicos, pulverizações de aerossóis, cremes  
tópicos, xaropes ou suspensões líquidas, emulsões ou solu-  
ções podem ser a forma de dosagem.

25 Para aplicação parenteral, são particularmente a-  
propriadas soluções estéreis, injetáveis, preferivelmente  
soluções não-aquosas ou aquosas, assim como dispersões, sus-  
pensões, emulsões, ou implantes, incluindo supositórios. Am-

polas são freqüentemente convenientes dosagens unitárias. Forma depósito injetável também pode ser apropriada e pode ser fabricada através de formação de matrizes microencapsuladas da droga em polímeros biodegradáveis como polilactídeo-poliglicolídeo, poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Dependendo da razão de droga para polímero e a natureza do particular polímero empregado, a taxa de liberação de droga pode ser controlada.

Formulações depósitos injetáveis também são preparadas através de arraste da droga em lipossomas ou microemulsões que são compatíveis com tecidos de corpo. As formulações injetáveis podem ser esterilizadas, por exemplo, por filtração através de um filtro retendo bactéria ou por incorporação de agentes esterilizantes na forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas ou dispersas em água estéril ou outros meios estéreis justo antes de uso.

Para aplicação enteral, são particularmente apropriados comprimidos, drágeas, líquidos, gotas, supositórios, ou cápsulas como cápsulas moles de gelatina. Um xarope, elixir, ou semelhante pode ser usado onde um veículo adoçado é empregado.

Como notado, outro sistema de liberação pode incluir sistema de liberação com tempo, liberação retardada ou liberação sustentada. Tal sistema pode evitar repetidas administrações dos compostos da invenção, aumentando conveniência para o paciente e o médico e mantendo sustentados níveis de compostos em plasma. Muitos tipos de sistema de liberação controlada são disponíveis e conhecidos por aqueles

versados na técnica. Composições de liberação sustentada ou controlada põem ser formuladas, por exemplo, como lipossomas ou aquelas onde o composto ativo é protegido com revestimentos de degradação diferenciada, tal como através de microencapsulação, revestimentos múltiplos, etc.

Por exemplo, compostos desta invenção podem ser combinados com matrizes de liberação sustentada farmacêuticamente aceitáveis, tais como polímeros biodegradáveis, para formação de composições terapêuticas. Uma matriz de liberação sustentada, como aqui usada, é uma matriz fabricada de materiais, usualmente polímeros, que são degradáveis por hidrólise de ácido - base ou enzimática ou através de dissolução. Uma vez inserida no corpo, a matriz é atuada por enzimas e fluidos do corpo. Uma matriz de liberação sustentada pode ser desejavelmente escolhida a partir de materiais biocompatíveis como lipossomas, sistema baseado em polímero como polilactídeos (ácido poli lático), poliglicolídeo (polímero de ácido glicólico), polilactídeo co-glicolídeo (copolímeros de ácido lático e ácido glicólico), polianidridos, poli(orto)ésteres, polissacarídeos, poliaminoácidos, ácido hialurônico, colágeno, sulfato de condroitina, polinucleotídeos, polivinil propileno, polivinil pirrolidona, e silicone; sistema não-polímero tal como ácidos carboxílicos, ácidos graxos, fosfolipídeos, aminoácidos, lipídeos como esteróis, sistema de liberação de hidrogel, sistema silástico; sistema baseado em peptídeo; implantes e semelhantes. Exemplos específicos incluem, mas não são limitados a: (a) sistema erosional no qual o polissacarídeo está contido em uma

forma dentro de uma matriz, encontrado em patentes US 4 452 775, 4 675 189, e 5 736 152 (aqui incorporadas por referência em suas totalidades), e (b) sistema difusional onde um componente ativo permeia em uma taxa controlada a partir de um polímero tal como descrito na patente US 3 854 480, 5 133 974 e 5 407 686 (aqui incorporadas por referência em suas totalidades). Em adição, sistema de liberação hard-wired baseado em bomba pode ser usado, alguns dos quais são adaptados para implante. Apropriados revestimentos entéricos são descritos em PCT WO 98/25613 e patente US 6 274 591, ambas aqui incorporadas por referência.

Uso de um implante de liberação sustentada pode ser particularmente apropriado para tratamento de condições crônicas. Liberação de "longo termo", como aqui usada, significa que o implante é construído e arranjado para liberar níveis terapêuticos do ingrediente ativo por pelo menos 7 dias, e apropriadamente 30 a 60 dias. Implantes de liberação sustentada de longo termo são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e incluem alguns dos sistemas de liberação descritos acima.

Para aplicação tópica, são empregados como forma não-espargível, forma viscosa a semi-sólida ou sólida compreendendo um carreador compatível com aplicação tópica e tendo uma viscosidade dinâmica preferivelmente maior que água. Apropriadas formulações incluem, mas não são limitadas a, soluções, suspensões, emulsões, cremes, ungüentos, pulverizados, linimentos, salvias, aerossóis, etc., que são, se desejado, esterilizadas ou misturadas com agentes auxilia-

res, por exemplo, preservativos, etc.

Liberação transdérmica ou iontoforética de composições farmacêuticas dos antagonistas de opióides periféricos também é possível.

5 Com relação a MNTX especificamente, formulações aquosas podem incluir um agente quelante, um agente tampicante, um antioxidante e, opcionalmente, um agente de isotonicidade, preferivelmente pH ajustado para entre 3,0 e 3,5. Tais formulações preferidas que são estáveis para autoclavagem e estocagem de longo termo são descritas no pedido de  
10 patente 10/821811, agora publicado como 20040266806, intitulada "Pharmaceutical Formulation", a exposição da qual é aqui incorporada por referência.

Em uma realização, compostos da invenção são administrados em um regime de dosagem que provê um regime de dosagem contínuo para o composto a um sujeito, por exemplo, um regime que mantém níveis mínimos em plasma do antagonista de opióides, e preferivelmente elimina as pontas e através de um nível de droga com regimes convencionais. Apropriadamente,  
20 te, uma dose contínua pode ser obtida através de administração de composto a um sujeito em uma base diária usando qualquer um dos processos de liberação aqui mostrados. Em uma realização, a dose contínua pode ser obtida usando infusão contínua para o sujeito, ou via um mecanismo que facilite a  
25 liberação do composto com o tempo, por exemplo, um emplastro transdérmico, ou uma formulação de liberação sustentada. Apropriadamente, compostos da invenção são continuamente liberados para o sujeito em quantidades suficientes para man-

ter uma concentração do composto no plasma do sujeito efetiva para inibir ou reduzir angiogênese induzida por opióide; ou em pacientes de câncer, para atenuar crescimento de um tumor. Compostos de acordo com a presente invenção, se providos sozinhos ou em combinação com outros agentes terapêuticos, são providos em uma quantidade anti-angiogênica efetiva. Será entendido, entretanto, que a utilização diária total dos compostos e composições da presente invenção serão decididas pelo médico atendente dentro do escopo de som de julgamento médico. O específico nível de dose terapêuticamente efetivo para qualquer paciente particular dependerá de uma variedade de fatores incluindo o distúrbio sendo tratado e a severidade do distúrbio; atividade do específico composto empregado; a específica composição empregada; a idade, peso de corpo, saúde geral, sexo e dieta do paciente; o tempo de administração; a rota de administração; a taxa de excreção do específico composto empregado; a duração do tratamento; drogas usadas em combinação ou simultâneas com o específico composto empregado e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas. Por exemplo, está bem dentro do nível de conhecimento comum na técnica iniciar doses do composto em níveis menores que aqueles requeridos para obtenção de desejado efeito terapêutico e aumentar gradualmente a dosagem até o desejado efeito ser obtido.

Se desejado, a dose diária efetiva pode ser dividida em múltiplas doses para propósitos de administração. Conseqüentemente, composições de dose simples podem conter tais quantidades ou seus submúltiplos para constituição de



dose diária. Como notado, aqueles versados na técnica facilmente otimizarão doses efetivas e regimes de co-administração (como aqui descrito) como determinado por boa prática médica e a condição clínica do paciente individual.

5                   Genericamente, doses orais dos antagonistas de opióides, particularmente antagonistas periféricos, irão variar de cerca de 0,01 a cerca de 80 mg/kg de peso de corpo por dia. É esperado que doses orais na faixa de 1 a 20 mg/kg de peso de corpo renderão os desejados resultados. Genericamente, administração parenteral, incluindo administração intravenosa e subcutânea, irá variar de cerca de 0,001 a 5 mg/kg de peso de corpo. É esperado que doses variando de 0,05 a 0,5 mg/kg de peso de corpo renderão os resultados desejados. Dosagem pode ser apropriadamente ajustada para obtenção de desejados níveis de droga, locais ou sistêmicos, dependendo do modo de administração. Por exemplo, é esperado que a dosagem para administração oral dos antagonistas de opióides em uma formulação revestida entericamente pode ser de 10 a 30% da dose oral não-revestida. No evento de que a resposta em um paciente seja insuficiente em tais doses, doses mesmo maiores (ou efetivamente dosagem maior que 30 através de uma rota de liberação mais localizada, diferente) pode ser empregada na extensão em que a tolerância do paciente permite. Doses múltiplas por dia são contempladas para obtenção de apropriados níveis sistêmicos de compostos. Apropriados níveis de sistema podem ser determinados através de, por exemplo, medição do nível da droga em plasma de paciente usando processos de HPLC rotineiros conhecidos por

aqueles versados na técnica.

Em algumas realizações da invenção, os antagonistas de opióides são co-administrados com o opióide. O termo "co-administração" é pretendido referir-se a uma terapia de  
5 combinação através de qualquer rota de administração na qual dois ou mais agentes são administrados a um paciente ou sujeito. Co-administração de agentes também pode ser referida como terapia de combinação ou tratamento de combinação. Os agentes podem estar nas mesmas formulações de dosagem ou  
10 formulações separadas. Para tratamento de combinação com mais de um agente ativo, onde os agentes ativos estão em formulações de dosagem separadas, os agentes ativos podem ser administrados simultaneamente, ou cada um deles pode ser administrado separadamente em momentos alternados. Os agen-  
15 tes podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente (por exemplo, um agente pode seguir diretamente administração do outro ou os agentes podem ser dados episodicamente, por exemplo, um pode ser dado em um momento seguido pelo outro em um momento posterior, por exemplo, dentro de  
20 uma semana), tanto quanto eles sejam dados em uma maneira suficiente para permitir que ambos agentes obtenham efetivas concentrações no corpo. Os agentes também podem ser administrados através de rotas diferentes, por exemplo, um agente pode ser administrado intravenosamente enquanto um segundo  
25 agente é administrado intramuscularmente, intravenosamente ou oralmente. Em outras palavras, a co-administração do composto antagonista de opióide de acordo com a presente invenção com um opióide é apropriadamente considerada uma prepa-

ração farmacêutica combinada que contém um antagonista de opióide e um agente opióide, a preparação sendo adaptada para a administração do antagonista de opióide periférico em uma base diária ou intermitente, e a administração de agente opióide em uma base diária ou intermitente. Assim, os antagonistas de opióides podem ser administrados antes de, simultâneos com, ou após administração dos opióides. Agentes co-administráveis também podem ser formulados como uma mistura, como, por exemplo, em uma formulação simples ou comprimido simples. Estas formulações podem ser parenterais ou orais, como as formulações descritas, por exemplo, nas patentes US 6 277 384; 6 261 599; 5 958 452 e PCT WO 98/25613, cada uma aqui incorporada por referência.

É ainda contemplado que o presente processo pode ser usado sozinho ou em conjunção com outros tratamentos para controle de crescimento ou migração de células endoteliais em conexão com as várias condições descritas acima. O antagonista de opióide periférico pode ser co-administrado com um outro agente terapêutico que não é um opióide ou antagonista de opióide. Apropriados tais agentes terapêuticos incluem agentes anti-câncer, por exemplo, agentes quimioterapêuticos, radioterapia, ou outros agentes anti-angiogênicos como suramin, ou mab anti-VEGF, uma endostatina ou radioterapia. É imaginado que os antagonistas de opióide de acordo com a presente invenção são de particular valor quando co-administrados com aqueles agentes que inibem atividade de VEGF, por exemplo, mab anti-VEGF. Os anticorpos anti-VEGF são úteis no tratamento de várias doenças neoplás-

ticas e não-neoplásticas e distúrbios, incluindo hiperplasia endometrial, endometriose, proliferação vascular anormal associada com facomatoses, edema (tal como aquele associado com tumores de cérebro e síndrome de Meig). Um exemplo de  
5 mab anti-VEGF é bevacizumab (Avastin, Genentech) descrito na patente US 6 884 879 e WO 94/10202 aqui incorporadas por referência em suas totalidades. Em certas realizações da invenção, MNTX é co-administrado com Avastatina.

Em outras palavras, os compostos da presente invenção também podem ser úteis para o tratamento de câncer em  
10 pacientes, como descrito acima, tanto quando usados sozinhos como em combinação com um ou mais outros agentes anti-câncer, por exemplo, radioterapia e/ou outros tratamentos quimioterapêuticos, incluindo angiogênicos convencionalmente  
15 administrados a pacientes para tratamento de câncer. As principais categorias e exemplos de tais drogas são aqui listadas e incluem, mas não são limitadas a inibidores de metaloprotease, inibidores de proliferação / migração de célula endotelial, antagonistas de fatores de crescimento an-  
20 giogênicos, inibidores de sinalização integrina / sobrevivência e quelantes de cobre.

Em certas realizações os compostos da invenção podem ser combinados com conhecidas combinações de agentes anti-câncer. Os compostos da invenção podem ser combinados com  
25 um agente anti-angiogênico e um agente quimioterapêutico e administrados a um paciente de câncer. Por exemplo, MNTX pode ser administrado a pacientes de câncer em combinação com Avastatina e 5-flúor uracila.

É antecipado que os antagonistas de opióide co-administrados com várias drogas anti-câncer, radioterapia ou outras drogas anti-angiogênicas podem originar a um efeito antiproliferativo significativamente aperfeiçoado sobre células cancerosas, e assim provendo um aumentado efeito terapêutico, por exemplo, emprego de antagonistas de opióide periférico para certos tumores pode potencializar sua resposta a outros regimes terapêuticos. Especificamente, um efeito anti-angiogênico significativamente aumentado é obtido com as combinações co-administradas mostradas acima utilizando menores concentrações do anti-câncer, uma menor dosagem de radiação, ou outras drogas anti-angiogênicas comparado aos regimes de tratamento nos quais as drogas ou radiação são usadas sozinhas, existe o potencial para prover terapia onde efeitos colaterais adversos associados com as drogas anti-câncer ou outras anti-angiogênicas ou radioterapia são consideravelmente reduzidos do que normalmente observado com as drogas anti-câncer ou outras anti-angiogênicas usadas sozinhas em maiores doses. Por exemplo, co-administração de um antagonista de opióide de acordo com a presente invenção com um agente anti-VEGF, por exemplo, mab anti-VEGF, pode reduzir a dose do agente anti-VEGF ou aumentar potência ou eficácia ou ambas. Ainda, como aqui detalhado, a co-administração de um antagonista de opióide de acordo com a presente invenção com outras modalidades anti-câncer pode ter valor profilático.

Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser co-

administrados com inibidores de metaloprotease tais como, por exemplo: Marimastat, inibidor de metaloprotease de matriz sintética (MMPI), British Biotech; Bay 12-9566, MMPI sintético e inibidor de crescimento de tumor, Bayer; AG3340, 5 MMPI sintético, Agouron/Warner-Lambert; CGS 27023A, MMPI sintético, Novartis; CGS 27023A, MMPI sintético; COL-3, MMPI sintético, derivado de tetraciclina, Collagenex; AE-941 (Neovastat), MMPI ocorrendo naturalmente, Aeterna, BMS-275291, MMPI sintético, Bristol-Myers Squibb; penicilamina, inibidor 10 de urocinase, NCI-NABTT.

Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser coadministrados com inibidores diretos de proliferação / migração de células endoteliais como: TNP-470 (derivado de fumagilina), inibe crescimento de célula endotelial, TAP Pharmaceuticals; esqualamina, inibe trocador de sódio- hidrogênio, NIHE3, Magainina; Combretastatina, indução de apoptose em células endoteliais proliferantes, Oxigene; endostatina, inibição de células endoteliais, EntreMed; penicilamina, 20 bloqueia migração e proliferação de células endoteliais, NCI-NABTT; inibidor de farnesil transferase (FTI), bloqueia migração e proliferação de células endoteliais, NCI-NABTT, -L-778 123 Merck, -SCH66336 Schering-Plough, -R115777 Janssen.

25 Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser coadministrados com antagonistas de fatores de crescimento angiogênicos tais como: anticorpo anti-VEGF, anticorpo mono-

clonal que inativa VEGF, Genentech; talidomida, bloqueia atividade de fatores de crescimento angiogênicos (bFGF, VEGF, TNF-alfa), Celgene; SU5416, bloqueia sinalização de receptor de VEGF (Flk-1/KDR) (tirosina cinase), Sugen-NCI; ribozima  
 5 (Angiozima), atenua ARNm de receptores de VEGF, Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.; SU6668, bloqueia sinalização de receptor de VEGF, bFGF, e PDGF, Sugen; PTK787/ZK22584, bloqueia sinalização de receptor de VEGF, Novartis; Interferon-  
 alfa, inibição de produção de bFGF e VEGF; Suramina, blo-  
 10 queia ligação de fator de crescimento a seu receptor, NCI-NABTT.

Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser coadministrados com drogas que inibem sinalização de integrina  
 15 / sobrevivência específica endotelial: Vitaxina, anticorpo para alfa-v-beta3 integrina presente sobre a superfície de célula endotelial, Ixsys; EMD121974, bloqueador de molécula pequena de integrina presente sobre superfície de célula endotelial, Meck KGaA.

20 Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser coadministrados com quelantes de cobre, como: penicilamina, ligantes de grupo sulfidrila de cobre; limpeza de cobre através de excreção urinária, NCI-NABTT; tetra tiomolibdato,  
 25 grupos tióis ligam fortemente cobre, inativam cobre disponível para tumor, University of Michigan Cancer Center; captopril, quela cobre e zinco; também, inibidor de enzima de conversão de MMP e angiotensina, Northwestern University.

Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser co-administrados com antagonistas de angiogênese com mecanismos distintos: CAI, inibidor de influxo de cálcio, NCI; ABT-627, antagonista de receptor de endotelina, Abbott/NCI; CM101/ZD0101, toxina Strep grupo B que interrompe seletivamente proliferação de endotélio através de interação com o receptor (CM201), CarboMed/Zeneca; interleucina-12, indução de interferon-gama, regulação descendente de IL-10, indução de IP-10, M.D. Anderson Cancer Center / Temple University, Genetics Institute, Hoffman LaRoche; IM862, bloqueia produção de VEGF e bFGF; aumenta produção do inibidor IL-12, Cytran; PNU-145156E, bloqueia angiogênese induzida por proteína Tat, Pharmacia and Upjohn.

Quando usados no tratamento de doenças hiperproliferativas, compostos da presente invenção podem ser co-administrados com agentes quimioterapêuticos tais como, por exemplo, alfa interferon, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato e prednisona), etoposide, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina e dexametasona), PRO-MACE/MOPP (prednisona, metotrexato (resgate w/leucovina), doxorubicina; ciclo fosfamida, paclitaxol, docetaxol, etoposide / mecloretamina, vincristina, prednisona e procarbazina), vincristina, vinblastina, angiostatinas, TNP-470, poli sulfato de pentosan, fator de plaqueta 4, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG e semelhantes.

Agentes anti-câncer que podem ser co-administrados



com compostos da presente invenção também incluem apropriadamente anti-metabólitos (por exemplo, 5-flúor uracila, metotrexato, fludarabina), agentes antimicrotúbulos (por exemplo, vincristina, vinblastina, taxanos tais como paclitaxel, docetaxel), um agente alquilante (por exemplo, ciclofosfamida, melfalan, biocloroetil nitroso uréia, hidroxí uréia), nitrogênio mostardas (por exemplo, mecloetamina, melfan, clorambucil, ciclofosfamida e ifosfamida); nitroureias (por exemplo, carmustina, lomustina, semustina e estreptozocina);  
10 agentes platina (por exemplo, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, JM-216, C1-973), antraciclinas (por exemplo, doxorubicina, daunorubicina), anticorpos (por exemplo, mitomicina, idarubicina, adriamicina, daunomicina), inibidores de topoisomerase (por exemplo, etoposide, camptotecinas), sulfonatos de alquila incluindo busulfan; triazinas (por exemplo, dacarbazina); etieniminas (por exemplo, tiotepa e hexa metil melamina); análogos de ácido fólico (por exemplo, metotrexato); análogos de pirimidina (por exemplo, 5-flúor uracila, citosina arabinosídeo); análogos de purina (por exemplo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina); antibióticos anti-tumor (por exemplo, actinomicina D; bleomicina, mitomicina C e metramicina); hormônios e antagonistas de hormônios (por exemplo, tamoxifen, corticosteróides) e quaisquer outros agentes citotóxicos (por exemplo, fosfato de estramustina, prednimustina).  
25

Será entendido que agentes que podem ser combinados com os compostos da presente invenção para a inibição, tratamento ou profilaxia de angiogênese e/ou cânceres não

são limitados àqueles listados acima, mas incluem, em princípio, quaisquer agentes úteis para o tratamento de doenças angiogênicas e crescimento de tumor induzidos por opióide.

A presente invenção é ainda explicada através dos seguintes exemplos, que não devem ser construídos por meio de limitação de escopo da presente invenção.

#### Exemplos

##### Exemplo 1: Ensaio de Migração de Células Endoteliais

A atividade anti-angiogênica dos antagonistas de opióide periférico de acordo com a presente invenção foi avaliada em experimentos testando a habilidade do antagonista para inibir ou modular migração de células endoteliais capilares usando uma câmara Boyden modificada.

O ensaio de migração de células endoteliais foi realizado como descrito por Lingen, M.W., Methods in Molecular medicine, 78:337-347 (2003), a exposição do qual é aqui incorporada por referência. Em resumo, células endoteliais microvasculares humanas (HMVEC) (Cell Systems, Kirkland, WA.) foram privadas por toda noite em meio de crescimento endotelial (EGM) contendo albumina de soro bovino 0,1% (BSA). Células foram então tripsinizadas e resuspensas em meio Eagle Modificado Dulbecco (DME) com BSA 0,1% em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Células foram adicionadas ao fundo de uma câmara Boyden modificada de 48 cavidades (NeuroPore Corporation, Pleasanton, CA.). A câmara foi montada e invertida, e células foram deixadas ligarem-se por 2 horas a 37°C a membranas de quimiotaxia de polycarbonato (5

$\mu\text{m}$  de tamanho de poro) (NeuroProbe) que foram encharcadas em gelatina 0,1% por toda noite e secadas. A câmara foi então reinvertida e o composto a ser testado em concentrações variáveis em quádruplos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (como um controle positivo) ou veículo foram adicionados às cavidades da câmara superior (para um volume total de 50 mL); a aparelhagem foi então incubada por 4 horas a 37°C. Membranas foram recuperadas, fixadas e manchadas (DiffQuick, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) e o número de células que migraram para a câmara superior por 10 campos de alta energia foi contado. Migração de fundo para DME+BSA 0,1% foi subtraída e os dados reportados como o número de células que migraram por 10 campos de alta energia (400 vezes). Cada substância foi testada em quádruplicata em cada experimento, e todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. VEGF (R&D System, Minneapolis, MN) foi usado como um controle positivo em uma concentração de 200 pg/mL. A concentração ótima para VEGF foi determinada previamente através de experimentos de dose - resposta (dados não mostrados). Os compostos testados como descrito acima foram morfina, naloxona, metil naltrexona, e a combinação de metil naltrexona e morfina. As concentrações de cada substância testada variaram de 0,001 a 10,0  $\mu\text{M}$ . A concentração da morfina foi constante em 0,1  $\mu\text{M}$ . Os resultados são mostrados na Fig. 1.

A Fig. 1 mostra que morfina aumentou migração em uma maneira dependente de concentração. A co-adição de metil naltrexona e morfina, entretanto, diminuiu migração em uma

maneira dependente de concentração. Nem metil naltrexona nem naloxona sozinho afetou migração.

#### Exemplo 2:Ensaio de Migração de Células Endoteliais

5 Um outro conjunto de experimentos foi conduzido de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1. Neste conjunto de experimentos, metil naltrexona e a combinação de metil naltrexona e morfina foram novamente testados para habilidade de inibirem migração de células endoteliais. As  
10 concentrações de metil naltrexona quando testada sozinha variaram de 0,001 a 10,0  $\mu\text{M}$ . Em combinação, a concentrações de metil naltrexona variaram de 0,001 a 10,0  $\mu\text{M}$ , enquanto a concentração de morfina permaneceu constante em 0,1  $\mu\text{M}$  como descrito no Exemplo 1. Os resultados são mostrados na Fig.  
15 2.

A Fig. 2 mostra que a combinação de metil naltrexona e morfina diminuiu migração em uma maneira dependente de concentração, enquanto metil naltrexona sozinho não afeta migração.

#### 20 Exemplo 3:Migração de células endoteliais induzida por DAMGO

As drogas usadas neste estudo foram [D-Ala 2, N-McPhe4, Gly5-ol] encefalina ou DAMGO (Sigma, St. Louis, MO); naloxona (Sigma, St. Louis, MO); brometo de N-metil naltrexona ou metil naltrexona (Mallinckrodt Specialty Chemicals,  
25 Phillipsburg, NJ). O ensaio de migração de célula endotelial foi realizado como descrito anteriormente (9). Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (Cell Systems, Kir-

kland, WA) foram provadas por toda noite em meios contendo albumina de soro bovino 0,1% (BSA), colhidas, re-suspensas em meios Eagle modificados Dulbecco (DME) com BSA 0,1%, e revestidas sobre uma membrana gelatinizada semi - porosa em  
5 uma câmara Boyden modificada (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA). Substâncias testes foram então adicionadas às cavidades da câmara superior e células foram deixadas migrarem por quatro horas a 37°C.

Membranas foram recuperadas, fixadas e manchadas e  
10 o número de células que migraram para a câmara superior por dez campos de alta energia contado por um observador cegado. Migração de fundo para DME + BSA 0,1% foi subtraída e os dados reportados como o número de células migradas por 10 campos de alta energia (400x). cada substância foi testada em  
15 quadruplicata em cada experimento e todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. A concentração de DAMGO foi 1 µM, VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) foi usado como um controle positivo em uma concentração de 200 pg/mL. A concentração ótima para VEGF foi determinada previamente  
20 através de experimentos de dose - resposta (dados não mostrados).

Os resultados são mostrados na Fig. 3 que mostra que metil naltrexona e DAMGO diminuíram migração em uma maneira dependente de concentração. A Fig. 4 ilustra resultados  
25 similares com naloxona e DAMGO. O metabólito de morfina inativo M3G não exerce atividade angiogênica enquanto M6G conhecido atuar no receptor mu exibiu um efeito dependente de concentração sobre angiogênese (Fig. 5).

Exemplo 4: Tratamento de sujeitos humanos e mamíferos com metil naltrexona

Em um primeiro conjunto de experimentos, camundongos são induzidos a desenvolverem tumores através de trans-  
5 formação, endogamia ou transplante de células de tumor. Trinta e seis camundongos, cada um transportando tumores tendo um volume de pelo menos  $60 \text{ mm}^3$ , são randomicamente divididos em três grupos. O primeiro grupo recebe uma substância controle compreendendo nem um opióide nem um antagonista  
10 de opióide. O segundo grupo recebe um opióide, por exemplo, morfina administrada oralmente em uma dose de  $0,5 \text{ mg/kg/dia}$ . O terceiro grupo recebe um opióide, por exemplo, morfina administrada oralmente em uma dose de  $0,5 \text{ mg/kg/dia}$ , e o antagonista de opióide periférico metil naltrexona, administrado  
15 oralmente em uma dose de  $5 \text{ mg/kg/dia}$ .

Os compostos são administrados diariamente por um período de oito semanas. Diferenças na taxa de crescimento de tumor, tamanho de tumor, uma redução em angiogênese no tumor e mortalidade dos camundongos entre cada um dos grupos  
20 são anotadas. Os resultados demonstram que uma redução em crescimento de tumor e angiogênese comparada a controles ou morfina sozinha.

Em um segundo conjunto de experimentos, pacientes de câncer humanos são arrolados em um estudo. Arrolados no  
25 estudo são controlados para idade, estágio de doença, tipos de tratamento e fatores familiares e genéticos. Participantes são divididos em dois grupos de acordo com se estão recebendo opióides, por exemplo, morfina. O grupo recebendo

opióides é ainda randomicamente dividido em dois subgrupos. Um dos dois subgrupos recebendo opióides recebe um antagonista de opióide periférico, por exemplo, metil naltrexona administrado oralmente em uma dose de 5 mg/kg/dia por um período de oito semanas. Os outros dois subgrupos recebem placebo pelo mesmo período. Diferenças em crescimento de tumor, tamanho de tumor, uma redução em angiogênese no tumor e mortalidade dos participantes em cada um dos grupos são anotadas.

10                   Exemplo 5: Tratamento de sujeitos humanos e mamíferos com Alvimopan

Camundongos que foram induzidos ao desenvolvimento de tumores são submetidos ao protocolo como descrito no Exemplo 3, exceto que o antagonista de opióide periférico é alvimopan. Os resultados demonstram uma redução em crescimento de tumor e angiogênese comparado a controles ou opióide sozinho.

Pacientes de câncer humanos são arrolados em um estudo conduzido como descrito no exemplo 4, exceto que o antagonista de opióide periférico é alvimopan.

Exemplo 6: Terapias compreendendo co-administração do antagonista de opióide periférico Metil naltrexona e segundo agente terapêutico

Em um primeiro conjunto de experimentos, camundongos são induzidos ao desenvolvimento de tumores através de transformação, endogamia ou transplante de células de tumor. Quarenta e oito camundongos, cada um transportando tumores tendo um volume de pelo menos 60 mm<sup>3</sup>, são randomicamente di-

vididos em seis grupos. O primeiro grupo recebe uma substância controle que não compreende um opióide, um antagonista de opióide, ou um agente anti-câncer. O segundo grupo recebe um opióide, por exemplo, morfina administrada oralmente em dose de 0,5 mg/kg/dia. O terceiro grupo recebe um opióide, por exemplo morfina administrada oralmente em uma dose de 0,5 mg/kg/dia, e o antagonista de opióide periférico metil naltrexona, administrado oralmente em uma dose de 5 mg/kg/dia. O quarto grupo recebe um opióide, por exemplo, morfina administrada oralmente em uma dose de 0,5 mg/kg/dia, e o antagonista de opióide periférico metil naltrexona administrado oralmente em uma dose de 5 mg/kg/dia com um agente terapêutico anti-câncer, por exemplo, bevacizumab (Avastin) em uma dose de 5 mg/kg cada 14 dias. O sexto grupo recebe um opióide, por exemplo, morfina, em uma dose de 0,5 mg/kg/dia e um agente terapêutico anti-câncer, por exemplo, bevacizumab (Avastin) em uma dose de 5 mg/kg cada 14 dias.

Os compostos são administrados diariamente por um período de oito semanas. Diferenças na taxa de crescimento de tumor, tamanho de tumor, uma redução em angiogênese no tumor e mortalidade dos camundongos em cada um dos grupos são anotadas. Os resultados demonstram um resultado aperfeiçoado (por exemplo, redução em angiogênese e crescimento de tumor) para os grupos administrados com a combinação de opióide, antagonista de opióide, e agente anti-câncer comparada aos outros grupos.

Em um segundo conjunto de experimentos, pacientes de câncer humanos recebendo um opióide, por exemplo, morfi-



na, um agente terapêutico anti-câncer, por exemplo, bevacizumab (Avastin) ou ambos são arrolados em um estudo. Arrolados no estudo são controlados para idade, estágio e tipo de doença, tipos de tratamento e fatores genéticos e familiares. Participantes recebendo um opióide são divididos randomicamente em primeiro e segundo grupos; participantes recebendo um agente terapêutico anti-câncer, por exemplo, bevacizumab (Avastin) são randomicamente divididos em terceiro e quarto grupos; participantes recebendo um opióide plus agente terapêutico anti-câncer, por exemplo, bevacizumab (Avastin) são randomicamente divididos em quinto e sexto grupos. O primeiro, terceiro e quinto grupos cada um recebe um antagonista de opióide periférico, por exemplo, metil naltrexona administrado oralmente em uma dose de 5 mg/kg/dia por um período de oito semanas. O segundo, quarto e sexto grupos recebem placebo pelo mesmo período. Diferenças em taxa de crescimento de tumor, tamanho de tumor, uma redução em angiogênese no tumor e mortalidade dos participantes em cada um dos grupos são anotadas. Os resultados demonstram um resultado aperfeiçoado (por exemplo, redução em angiogênese e crescimento de tumor) para os grupos administrados com a combinação de opióide, antagonista de opióide, e agente anti-câncer comparados aos outros grupos.

Exemplo 7: Terapias compreendendo co-administração do antagonista de opióide periférico alvimopan e segundo agente terapêutico

Camundongos que foram induzidos ao desenvolvimento de tumores são submetidos ao protocolo como descrito no E-

xemplo 5, exceto que o antagonista de opióide periférico é alvimopan. Os resultados demonstram um aperfeiçoado resultado (por exemplo, redução em angiogênese e crescimento de tumor) para os grupos administrados com a combinação de opióide, antagonista de opióide, e agente anti-câncer comparados aos outros grupos.

Pacientes de câncer humanos são arrolados em um estudo conduzido como descrito no Exemplo 6, exceto que o antagonista de opióide periférico é alvimopan. Os resultados demonstram um resultado aperfeiçoado (por exemplo, redução em angiogênese e crescimento de tumor) para os grupos administrados com a combinação de opióide, antagonista de opióide, e agente anti-câncer comparados aos outros grupos.

Exemplo 8: Efeito de antagonistas de opióide sobre migração / proliferação de células endoteliais

Cultura de células e reagentes - células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (Cell Systems, Kirland, WA) e células endoteliais microvasculares pulmonares humanas (Clonetics, Walkersville, MD) foram cultivadas como descrito anteriormente em meio completo EBM-2 (Clonetics) a 37°C em uma atmosfera umedecida de 5% CO<sub>2</sub>, 95% ar, com passagens 6-10 usadas para experimentação (Garcia et al., 2001). A menos que de outro modo especificado, reagentes foram obtidos de Sigma (St. Louis, MO). Reagentes para eletroforese de SDS-PAGE foram adquiridos de Bio-Rad (Richmond, CA), membrana de transferência Immobilon-P de Millipore (Millipore Corp., Bedford, MA). As drogas usadas neste estudo foram [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol] encefalina ou DAMGO (Sigma, St. Louis,

MO); naloxona, morfina-3-glicuronídeo (M3G) e morfina-6-glicuronídeo (M6G) (Sigma, St. Louis, MO); brometo de N-metil naltrexona ou metil naltrexona (Mallinckrodt Specialty Chemicals, Phillipsburg, NJ), morfina (Baxter, Deerfield, Illinois). Inibidor tirosina cinase receptor de VEGF foi adquirido de Calbiochem (San Diego, CA). Anticorpo anti-RhoA camundongo, anticorpo anti-fosfotirosina camundongo e pérolas conjugadas com domínio de ligação rho (RBD) foram adquiridos de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anticorpos receptor 1 anti-VEGF coelho (Flt-1) e receptor 2 anti-VEGF (Flk-1) foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticorpo anti-beta-actina camundongo foi adquirido de Sigma (St. Louis, MO). Anticorpos marcadores com peroxidase de raiz forte (HRP) secundários foram adquiridos de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

Materiais de imuno-precipitação e imuno-manchamento celular foram incubados com tampão IP (HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaF 40 mM, ácido okadáico 50 µM, fluoreto de fenil metil sulfonila, diluição 1:250 de mistura de inibidor de Calbiochem protease 3). As amostras foram então imuno-precipitadas com receptor 1 anti-VEGF ou IgG receptor 2 anti-VEGF seguido por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 4-15%, transferir sobre membranas de ImmobilonTM, e desenvolvidas com anticorpos primários e secundários específicos. Visualização de bandas imuno-reativas foi obtida usando quimioluminescência aperfeiçoada (Amersham Biosciences).

Determinação de fosforilação de tirosina de recep-

tores 1 e 2 de VEGF - Proteínas solubilizadas em tampão IP (ver acima) foram imuno-precipitadas com anticorpo receptor 1 anti-VEGF coelho ou receptor 2 anti-VEGF coelho seguido por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 4-15% e transferir  
 5 sobre membranas Immobilon™ (Millipore Corp., Bedford, MA). Após bloqueio de sítios não específicos com albumina de soro bovino 5%, as manchas foram incubadas com anticorpo receptor 1 anti-VEGF coelho, anticorpo receptor 2 anti-VEGF coelho ou anticorpo anti-fosfotirosina camundongo seguido por incuba-  
 10 ção com IgG anti-camundongo cabra ou anti-coelho cabra marcado com peroxidase de raiz forte (HRP). Visualização de bandas imuno-reativas foi obtida usando quimioluminescência aperfeiçoada (Amersham Biosciences).

Construção e transfecção de siRNA contra RhoA - A  
 15 sequência de siRNA alvejando humano contra RhoA foi gerada usando sequência de ARNm de Genbank (gi:33876092). Para cada ARNm (ou misturado), dois alvos foram identificados. Especificamente, sequência alvo RhoA 1 (5'-AAGAACTGGTGATTGTTGGT-3') (SEQ ID NO:1), sequência alvo RhoA 2 (5'-  
 20 AAAGACATGCTTGCTCATAGT-3') (SEQ ID NO:2), sequência misturada 1 (5'-AAGAGAAATCGAAACCGAAAA-3') (SEQ ID NO:3), e sequência misturada 2 (5'-AAGAACCCAATTAAGCGCAAG-3') (SEQ ID NO:4), foram utilizadas. Oligonucleotídeos sentido e anti-sentido foram adquiridos de Integrated DNA Technologies (Coraville,  
 25 IA). Para construção do siRNA, um kit baseado em transcrição de Ambion foi usado (Silencer siRNA construction kit). EC microvascula de pulmão humano foram então transfectadas com siRNA usando siPORTamine™ como o reagente de transfecção

(Ambion, TX) de acordo com o protocolo provido por Ambion. Células (~40% confluentes) foram privadas de soro por 1 hora seguido por incubação com 3  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{M}$  de cada siRNA) de siRNA (ou siRNA mistrado ou nenhum siRNA) por 6 horas em  
5 meios livres de soro. Os meios contendo soro foram então adicionados (concentração final de soro de 1%) por 42 horas antes de experimentos bioquímicos e/ou ensaios funcionais serem conduzidos.

Ensaio de ativação de Rho-A - Após tratamento com  
10 agonista e/ou inibidor, EC são solubilizadas em tampão de solubilização e incubadas com pérolas conjugadas com domínio de ligação rho (RBD) por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante é removido e as pérolas RBD com a forma ligada a GTP de RhoA ligada são lavadas extensivamente. As pérolas RBD são ebuli-  
15 das em tampão amostra SDS-PAGE e o material RhoA ligado é corrido sobre SDS-PAGE, transferido para Immobilon™ e imuno-manchado com anticorpo anti-RhoA (Garcia et al. 2001).

Ensaio de migração de EC microvascular dérmicas humanas - O ensaio de migração de células endoteliais foi  
20 realizado como descrito anteriormente (Lingen 2002). Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (Cell Systems, Kirkland, WA) foram privadas por toda noite em meios contendo albumina de soro bovino 0,1% (BSA), colhidas, re-suspensas em meios Eagle Modificado Dulbecco (DME) com BSA  
25 0,1%, e revestidas sobre uma membrana gelatinizada semi-porosa em uma câmara Boyden modificada (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA). Substâncias testes foram então adicionadas às cavidades da câmara superior, e células foram

deixadas migrar por 4 horas a 37°C. membranas foram recuperadas, fixadas, e manchadas e o número de células que migraram para a câmara superior por 10 campos de alta energia foi contado por um observador cegado. Migração de fundo de DME +  
5 BSA 0,1% foi subtraída, e os dados foram reportados como o número de células migradas por 10 campos de alta energia (400x). cada substância foi testada em quadruplicata em cada experimento e todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. Fator de crescimento endotelial vascular  
10 (VEGF, R&D Systems, Minneapolis, MN) foi usado como um controle positivo em uma concentração de 200 pg/mL. A concentração ótima para VEGF foi determinada previamente através de experimentos de dose - resposta (dados não mostrados).

Ensaio de migração de EC microvasculares pulmonares humanas - Vinte e quatro unidades Transwell com tamanho  
15 de poro de 8 M foram usadas para monitoração de migração de células in vitro. HPMVEC ( $\sim 1 \times 10^4$  células / cavidade) foram revestidas com vários tratamentos (MNTX 100 nM, inibidor de tirosina cinase de receptor de VEGF ou siRNA) para a câmara  
20 superior e vários agonistas foram adicionados à câmara inferior (MS, DAMGO ou VEGF, 100 nM). Células foram deixadas migrarem por 18 horas. Células das câmaras superior e inferior foram quantificadas usando o ensaio CellTiter96 MTS (Promega, San Luis Obispo, CA) e lidas em 492 nm. % de migração  
25 foi definida como o # de células na câmara inferior % de número de células em ambas câmaras superior e inferior. Cada ensaio foi feito em triplicata, repetido pelo menos cinco vezes e analisado estatisticamente por teste t de Student

(com significância estatística fixada em  $P < 0,05$ ).

Ensaio de proliferação de EC microvasculares pulmonares humanas - Para medição de crescimento de células, HPMVEC [ $5 \times 10^3$  células / cavidade pré-tratadas com vários a-

5 gentes (MNTX 100 nM, inibidor de tirosina cinase de receptor de VEGF 10  $\mu$ M ou siRNA) foram incubadas com 0,2 mL de meios livres de soro contendo vários agonistas MS, DAMGO ou VEGF 100 nM) por 24 horas a 37°C em 5%CO<sub>2</sub> / 95% ar em placas de cultura de 96 cavidades. O ensaio de proliferação de células

10 in vitro foi analisado através de medição de aumentos em número de células usando o ensaio CellTiter96 MTS (Promega, San Luis Obispo, CA) e lidas em 492 nm. Cada ensaio foi feito em triplicata, repetido pelo menos cinco vezes e analisado estatisticamente por teste t de Student (com significância

15 estatística fixada em  $P < 0,05$ ).

Usando o ensaio de migração de endotelial, foi verificado com MS causou um aumento dependente de concentração em migração endotelial. Naloxona e MNTX sozinhos não tiveram efeito sobre migração de células endoteliais sobre uma

20 ampla faixa de concentrações. Isto é demonstrado em fotomicrografias representativas e quantitativamente (Figs. 6 e 1, respectivamente). Em concentrações clinicamente relevantes de morfina, a magnitude do efeito foi aproximadamente 70% daquele obtido por VEGF. Migração de células endoteliais induzida por morfina em concentrações tão baixas como  $10^{-7}$ M

25 (Fig. 2). Migração de células endoteliais baseada em morfina foi atenuada pelos antagonistas de opióide mu naloxona e MNTX (em doses tão baixas como  $10^{-8}$   $\mu$ M) em uma maneira de-

pendente de concentração, sugerindo fortemente que migração de célula endotelial é mediada por ação de morfina sobre o receptor de opióide mu (MOR). Que o efeito é via o MOR antes que outros receptores de opióide foi confirmado por nossas  
5 observações de que o agonista mu de encefalina sintética altamente seletivo DAMGO também induziu migração em uma maneira dependente de concentração. O efeito de DAMGO também foi bloqueado por MNTX (Fig. 3). Que o metabólito de morfina inativado M3G não exerce atividade angiogênica, enquanto M6G,  
10 conhecido atuar no receptor mu, exibe um efeito dependente de concentração sobre angiogênese, confirma nossa hipótese de que efeito de morfina sobre o endotélio é mediado por receptores mu (McQuay et al. 1997) (Fig. 5).

De modo a avaliar os mecanismos de efeitos induzidos por opióide e MNTX sobre angiogênese, uma linha EC bem  
15 caracterizada foi usada, células endoteliais microvasculares pulmonares humanas (HPMVEC). Em concordância com os efeitos sobre EC microvasculares dérmicas humanas, foi observado que MS, DAMGO e VEGF induzem migração de HPMVEC que é inibida  
20 por MNTX (Fig. 7B). Foi mostrado que MS, DAMGO e VEGF também estimulam proliferação de HPMVEC que é atenuada por MNTX (Fig. 7A).

Considerando os efeitos inibidores de MNTX, um antagonista de receptor de opióide mu, sobre proliferação e  
25 migração de EC induzidas por VEGF, o papel de opióides sobre transativação de receptor de VEGF foi examinado. A Fig. 8A mostra que MS e DAMGO induzem fosforilação de tirosina de ambos receptor 1 (Flt-1) e 2 (Flk-1) de VEGF que é bloqueada



por MNTX. Ainda, MNTX atenua a fosforilação de tirosina de receptores 1 e 2 de VEGF induzida por VEGF. Estes resultados indicam que opióides induzem transativação de receptor de VEGF.

5 De modo a endereçar se atividade tirosina cinase de receptor de VEGF é requerida para angiogênese induzida por opióide, EC foram pré-tratadas com inibidor de tirosina cinase de receptor 1 e 2 de VEGF e medida a proliferação e migração de EC induzidas por opióide (Fig. 8B). Os resulta-  
10 dos indicam que a atividade tirosina cinase de receptores de VEGF é importante em funções angiogênicas de EC induzidas por opióide.

Uma importante molécula sinalizante envolvida em angiogênese é a proteína-G pequena, RhoA (Aepfelbacher et  
15 al. 1997; Cascone et al., 2003; Hoang et al. 2004; Liu and Senger 2004). Foi observado que MS, DAMGO e VEGF estimulam ativação de RhoA que é inibida por MNTX (Figura 9A). Ainda, transativação de receptor e VEGF é importante para ativação de RhoA induzida por opióide (Figura 9B). Silenciamento de  
20 expressão de RhoA bloqueia proliferação e migração de EC induzidas por opióide e VEGF (Fig. 10). Estes resultados indicam o papel central de ativação de RhoA sobre atividade angiogênica de EC induzida por agonista.

Tomadas como um todo estas verificações sugerem um  
25 modelo no qual o antagonista de receptor de opióide mu periférico, MNTX, atenua ativação de RhoA e receptor de VEGF induzida por VEGF. Esta atenuação é importante para o papel inibidor de MNTX sobre angiogênese mediada por opióide e

VEGF (Fig. 11).

Exemplo 9: Metil naltrexona inibe angiogênese induzida por SIP, VEGF e PDGF: papel de transativação de receptor

5           Ensaaios foram conduzidos de acordo com o procedimento similar àquele descrito em exemplos 1-3. Foi observado que SIP, VEGF, PDGF, morfina e DAMGO induziram proliferação (Fig.12) (como medida pelo Ensaio MTS CellTiter colorimétrico (Promega) e migração (Figura 13) (como medida pelo ensaio  
10 de filtro de membrana permeável Transwell (diâmetro de poro de 8  $\mu$ m)) de EC que foram inibidas por pré-tratamento com MNTX (0,1  $\mu$ M, 1 hora). Silenciamento de expressão de receptor de opióide mu (siRNA) bloqueia proliferação (Fig. 14) e migração (Fig.15) de EC induzida por morfina e DAMGO enquanto  
15 também inibindo significativamente proliferação (Fig. 14) e migração (Fig. 15) de EC induzidas por VEGF e PDGF. Imuno-precipitação seguida por análises de mancha imuno indicam que tratamento com SIP, VEGF e PDGF de fosforilação de serina / treonina induzida por EC do receptor de opióide mu  
20 (Fig. 16) (indicando transativação de receptor) e ativação da proteína G pequena reguladora cito-esquelética, RhoA (Fig. 17). Ainda, tratamento com morfina e DAMGO de EC induziu fosforilação de tirosina do receptor de VEGF (Figura 18), receptor de PDGF (Fig. 18) e receptor de S1 P3 (Fig. 19)  
25 junto com ativação de RhoA. Pré-tratamento com MNTX de EC atenuou eventos de fosforilação de receptor induzidos por morfina, DAMGO, SIP, VEGF e PDGF e ativação de RhoA. Finalmente, silenciamento de expressão de RhoA (siRNA) bloqueou

proliferação (Fig. 20) e migração (Fig. 21) de EC induzidas por agonista. Tomados juntos, estes resultados indicam que MNTX inibe proliferação e migração de EC induzidas por agonista via inibição de fosforilação / transativação de receptor e subsequente inibição de ativação de RhoA (Fig. 22). Estes resultados sugerem que inibição de angiogênese de MNTX pode ser uma intervenção terapêutica útil para tratamento de câncer.

Em resumo, a presente invenção provê processos de atenuação de migração e/ou proliferação de células endoteliais associadas com angiogênese e/ou aperfeiçoamento de função barreira de células endoteliais em tecido ou um órgão de um sujeito em sua necessidade através de administração de um ou mais antagonistas de opióides, especialmente antagonistas de opióides periféricos, em uma quantidade efetiva para o paciente para inibir a migração e/ou proliferação e angiogênese, e/ou aperfeiçoar função barreira. Os processos da presente invenção também podem envolver administração de um antagonista de opióide periférico a um paciente recebendo tratamento de opióide. Especialmente apropriado pode ser um antagonista de opióide periférico mu. A presente invenção também provê processos de co-administração de um opióide e um antagonista de opióide periférico a um sujeito em sua necessidade. O antagonista de opióide periférico também pode ser co-administrado com um agente anti-câncer, como pode a combinação do opióide e antagonista de opióide periférico ser co-administrada com um agente anti-câncer.

Embora a presente invenção tenha sido agora des-

crita e exemplificada com alguma especificidade, aqueles versados na técnica apreciarão as várias modificações, incluindo variações, adições, e omissões que podem ser feitas no que foi descrito. Da mesma maneira, é pretendido que estas modificações também sejam abrangidas pela presente invenção e que o escopo da presente invenção seja unicamente limitado pela mais ampla interpretação que juridicamente pode ser acordada pelas reivindicações apostas.

Todas as patentes, publicações e referências aqui citadas são inteiramente aqui incorporadas por referência. Em caso de conflito entre a presente exposição e patentes, publicações e referências incorporadas, a presente exposição deve controlar.

# LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
 <120> "USO DE ANTAGONISTAS OPIÓIDES PARA ATENUAÇÃO DE  
 PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS"  
 <130> 092234-9035-W000  
 <150> 60/659,193  
 <151> 2005-03-07  
 <150> 60/725,703  
 <151> 2005-10-12  
 <150> 60/731,009  
 <151> 2005-10-28  
 <150> 60/760,851  
 <151> 2006-01-20  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 aagaaactgg tgattgttgg t 21  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 aaagacatgc ttgctcatag t 21  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 aagagaaatc gaaaccgaaa a 21  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 aagaacccaa ttaagcgcaa g 21

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender administração a um sujeito com um distúrbio caracterizado por indesejada migração ou proliferação de células endoteliais, de uma quantidade efetiva de um antagonista opióide.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a migração ou proliferação indesejada de células endoteliais é indesejada migração ou proliferação de células endoteliais vasculares.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista opióide é um antagonista opióide periférico.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a indesejada migração ou proliferação de células endoteliais vasculares é angiogênese indesejada.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é um câncer.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a quantidade efetiva é tal que o sujeito tem níveis em plasma de sangue circulante efetivos do antagonista opióide continuamente por pelo menos 1 semana, pelo menos 2 semanas, pelo menos três semanas, e, preferivelmente, pelo menos 4 semanas.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de ainda compreender co-

administração ao sujeito de uma quantidade de um agente anti-câncer.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente anti-câncer é um agente anti-neovascularização.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente anti-neovascularização é um anticorpo monoclonal anti-VEGF.

10. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é diabetes.

11. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é anemia de célula foice.

12. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é um ferimento vascular.

13. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é **CARACTERIZADO** por indesejada neovascularização ocular.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é uma retinopatia proliferativa.

15. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista opióide é um antagonista opióide periférico.

16. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sujeito está tomando simultânea terapia opióide.

17. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sujeito não está tomando simultânea terapia opióide.

18. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sujeito está tomando simultânea terapia opióide crônica.

19. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sujeito não está tomando simultânea terapia opióide crônica.

20. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista opióide é selecionado do grupo consistindo em: derivado morfina quaternário ou terciário, um N-alkil carboxilato de piperidina, e um benzomorfa quaternário.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista opióide periférico é metil naltrexona.

22. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista opióide periférico é alvimopam.

23. Método de inibição de atividade VEGF em células endoteliais, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista opióide.

24. Método de inibição de migração ou proliferação celular induzida por opióide exógeno em células endoteliais, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista opióide.



25. Método de inibição de ativação de Rho A em células endoteliais, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista opióide.

5                    26. Método de atenuação de indesejada migração e/ou proliferação de células endoteliais, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender contato de células com uma quantidade efetiva de um antagonista opióide.

27. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
10 **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma quantidade do antagonista opióide é administrada a um paciente de câncer humano, cuja quantidade é efetiva para atenuar a indesejada migração e/ou proliferação.

28. Método de redução de risco de recorrência de  
15 um câncer ou tumor após intervenção médica, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender co-administração de um antagonista opióide a um paciente de câncer no momento da intervenção.

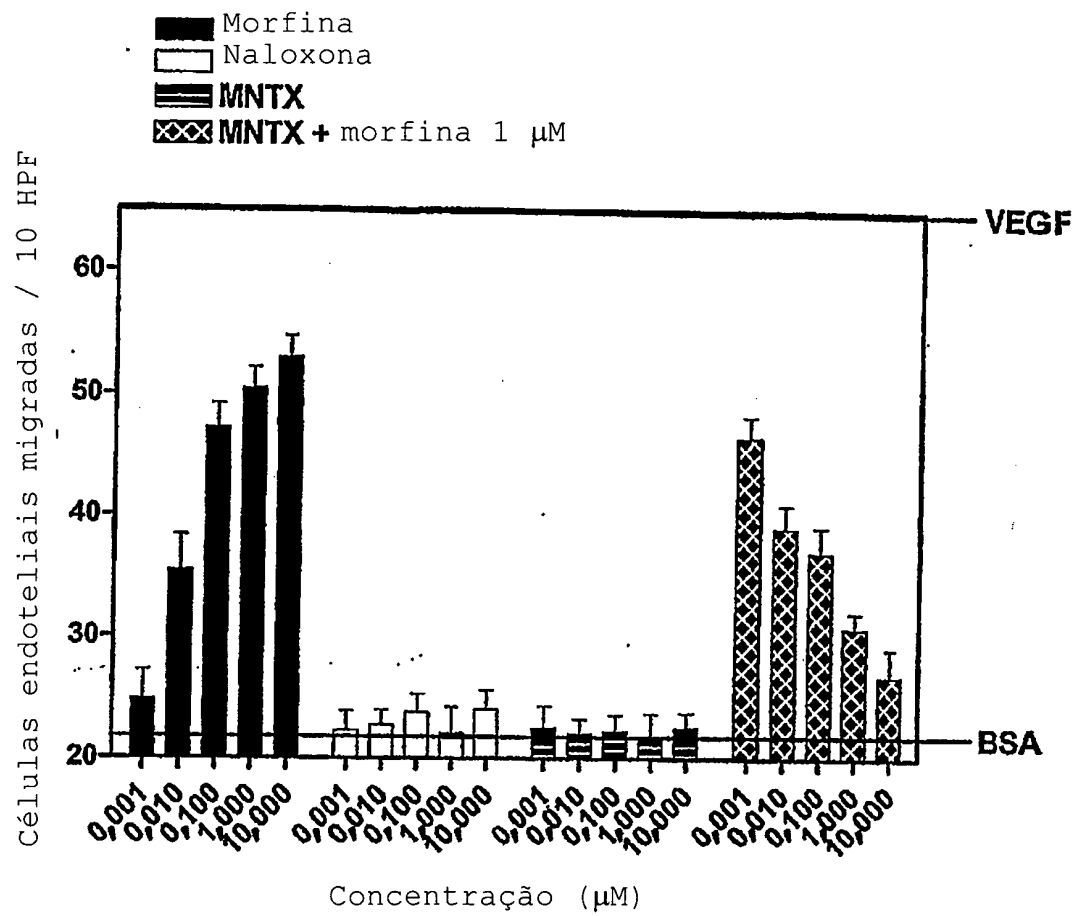


FIG.1

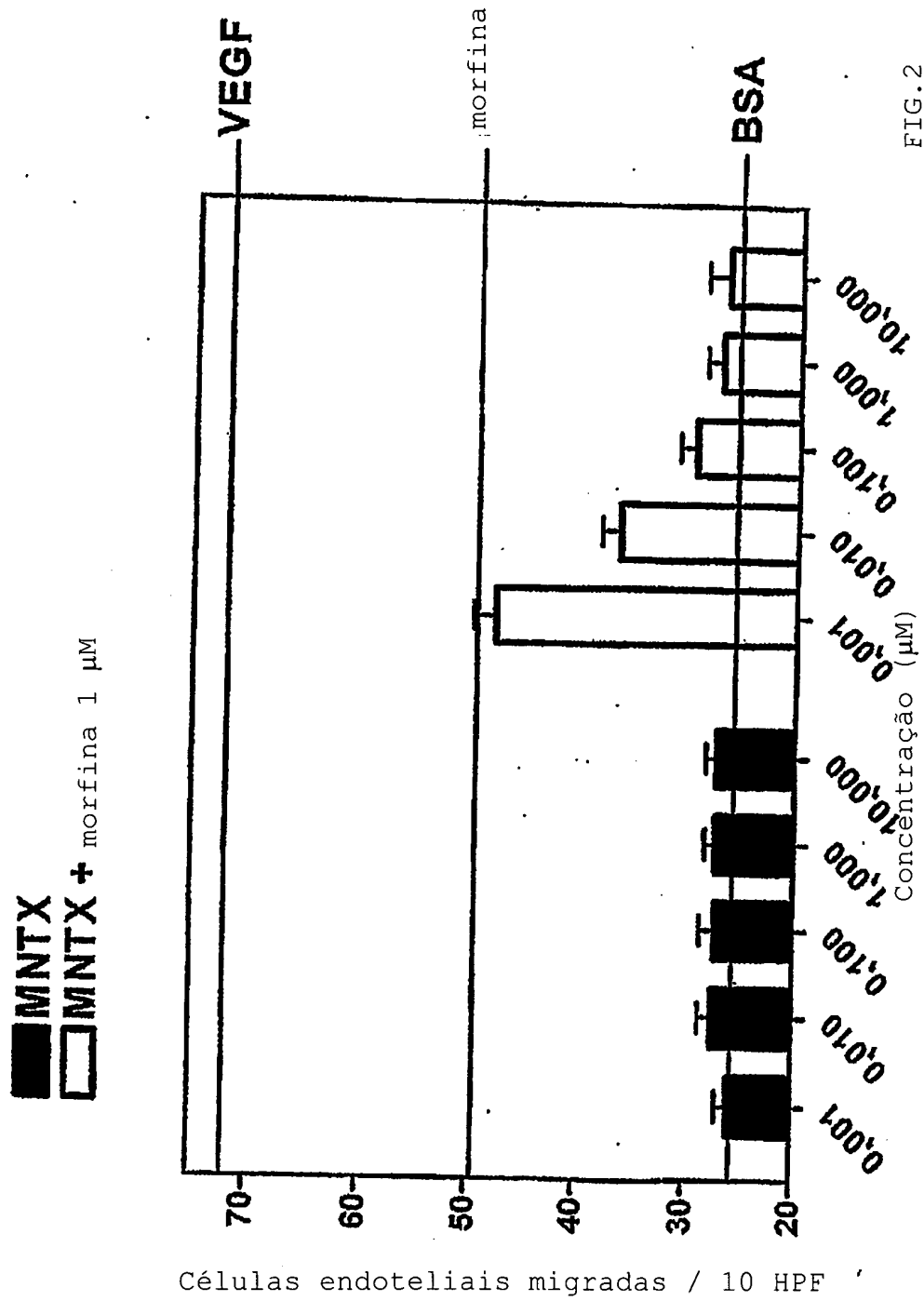


FIG.2

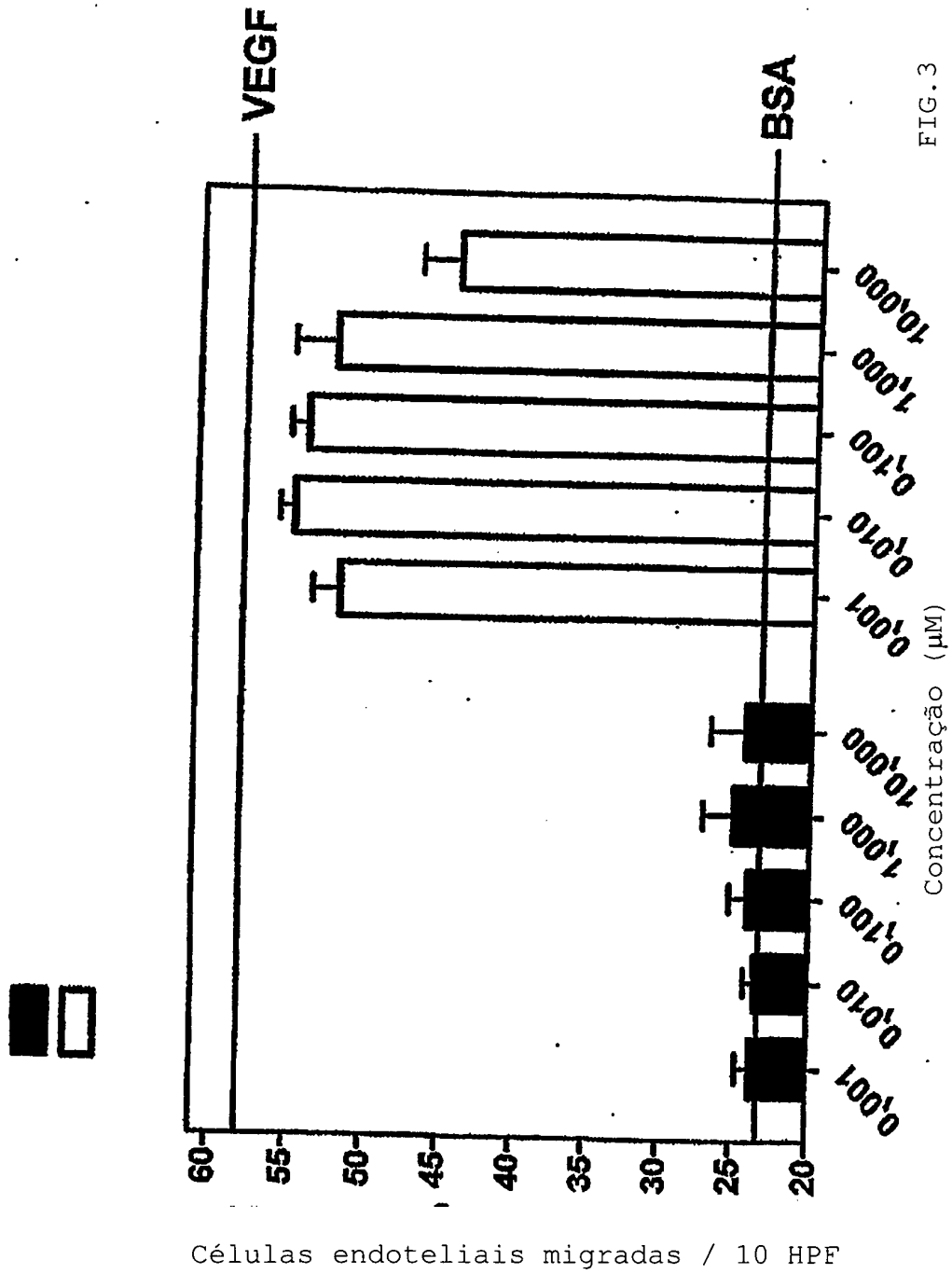


FIG.3

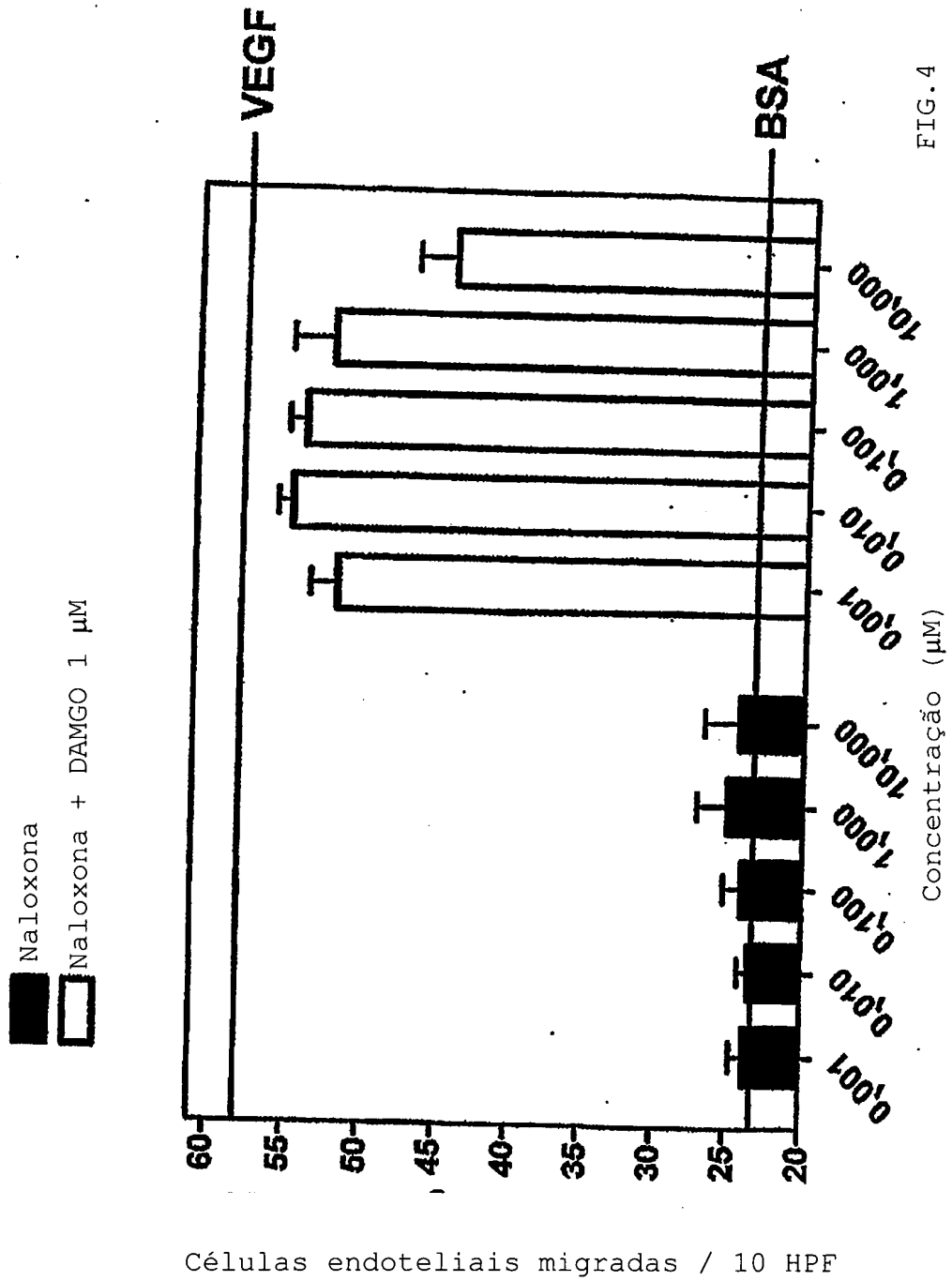


FIG. 4

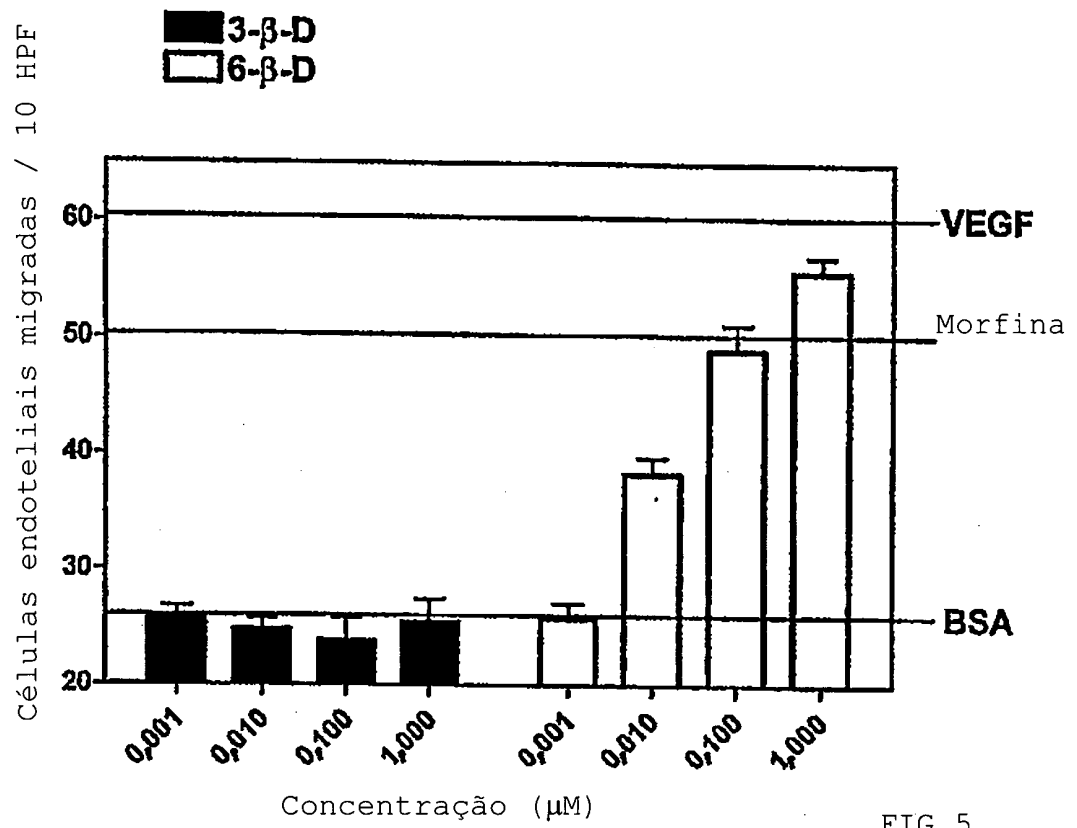


FIG.5

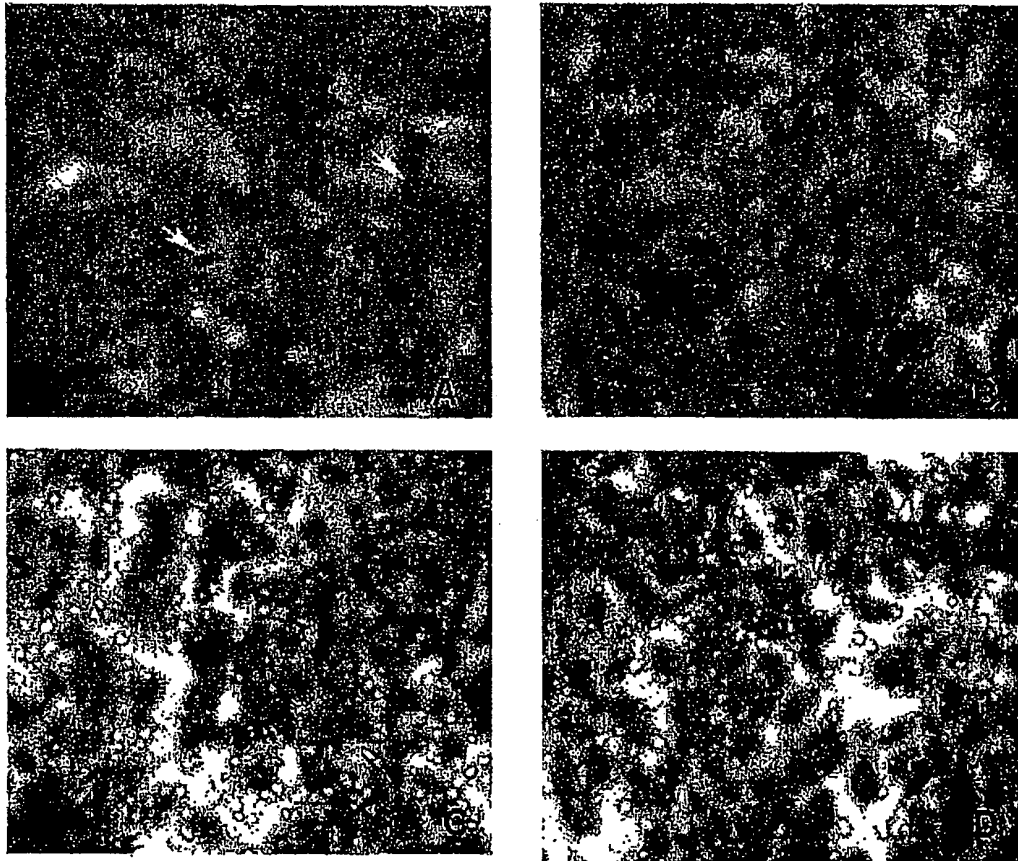


FIG. 6

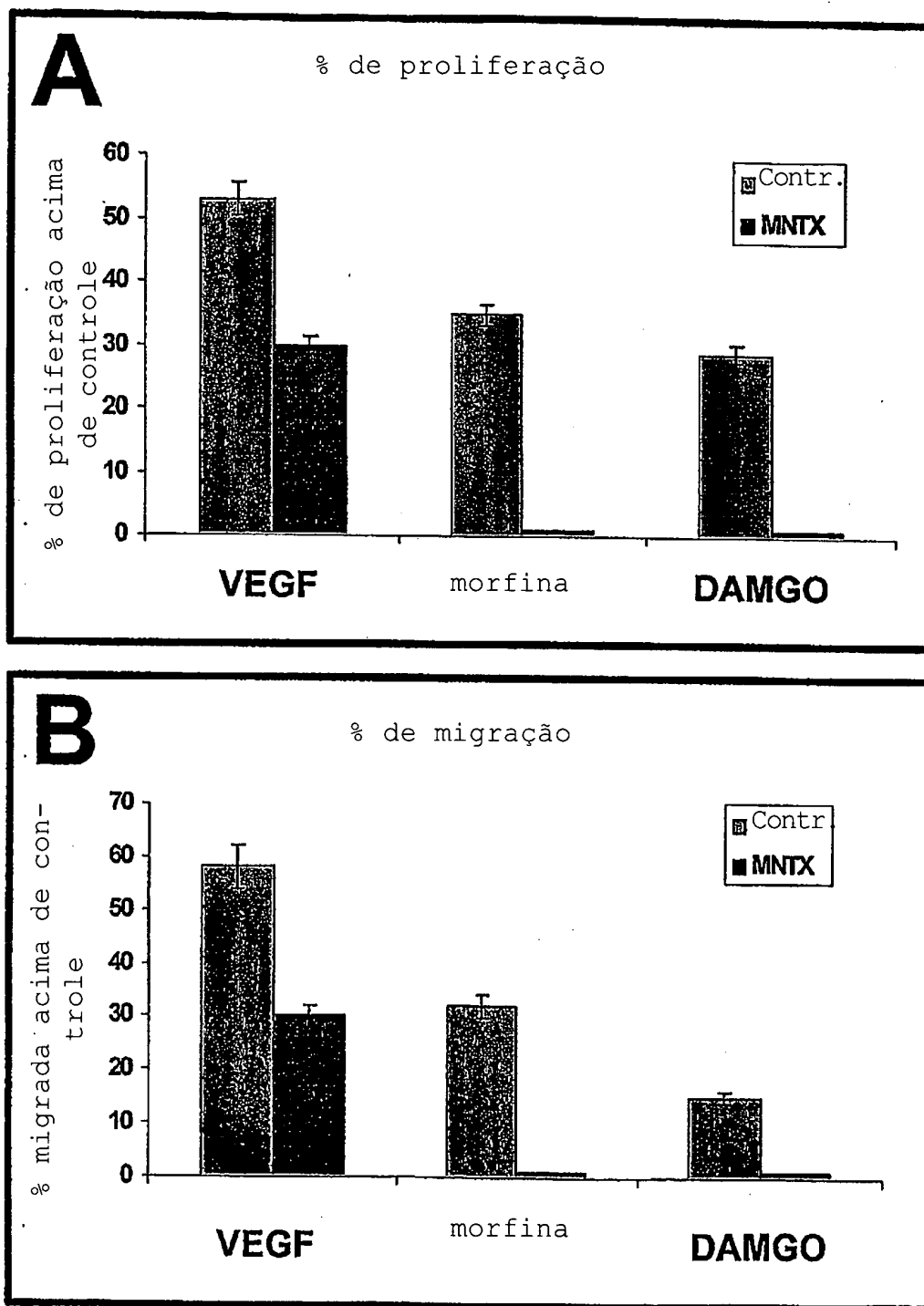
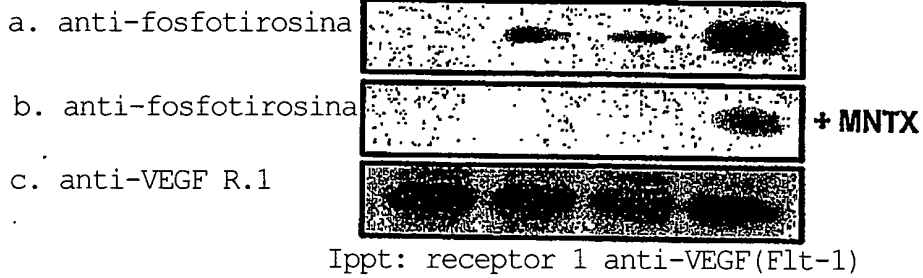


FIG.7



**A**

Mancha Imuno: controle Mor- fina DAMGO VEGF (5 minutos)



Mancha Imuno: controle Mor- fina DAMGO VEGF

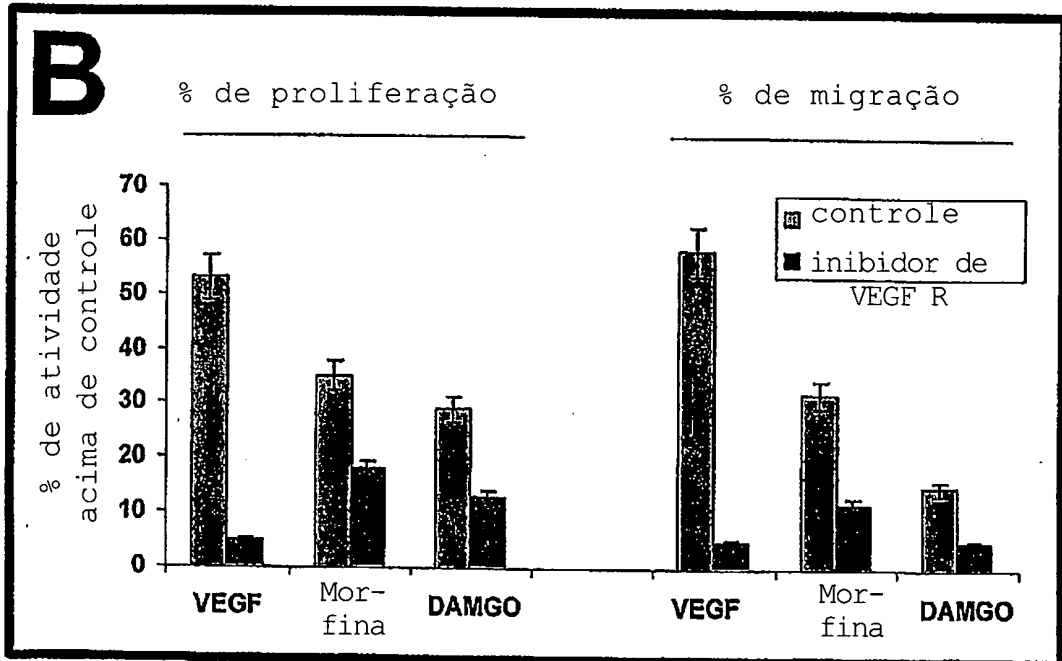
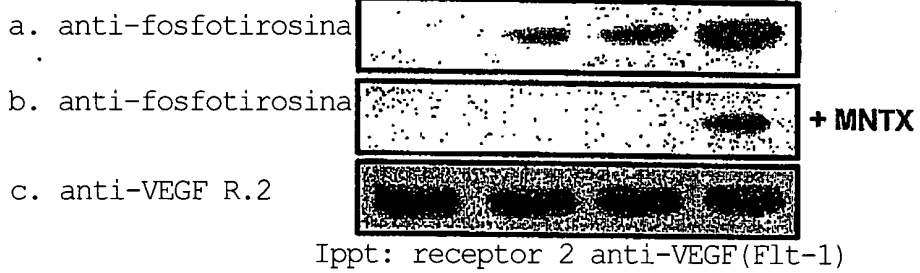
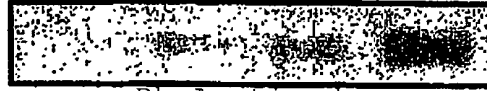


FIG.8

**A**

Mancha Imuno: controle Mor-fina **DAMGO VEGF** (5 minutos)

a. anti-RhoA



RhoA ativada

b. anti-RhoA



+ MNTX

RhoA ativada

c. anti-RhoA



RhoA total

**B**

Mancha Imuno: controle Mor-fina (5 minutos) Mor-fina sozinha inibidor VEGF R

a. anti-RhoA



RhoA ativada

b. anti-RhoA



RhoA total

**DAMGO** (5 minutos)

controle DAMGO sozinha inibidor VEGF R



RhoA ativada

c. anti-RhoA



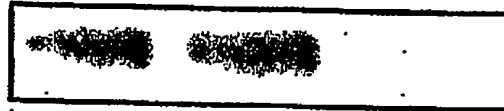
RhoA total

FIG. 9

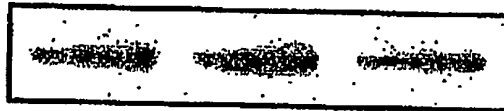
**A**

Mancha Imuno: controle (sem siRNA) siRNA misturado RhoA siRNA

a. anti-RhoA



b. anti-RhoA



lisado de HLMVEC

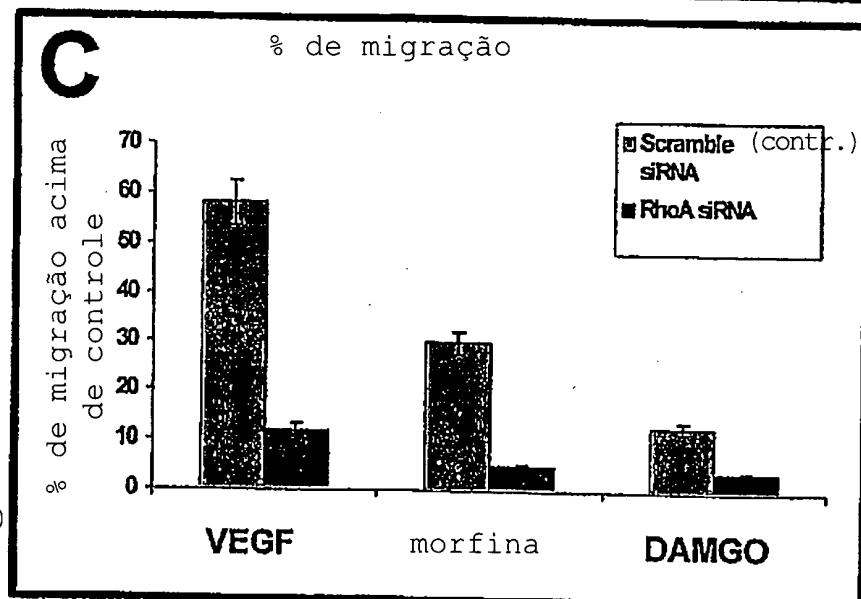
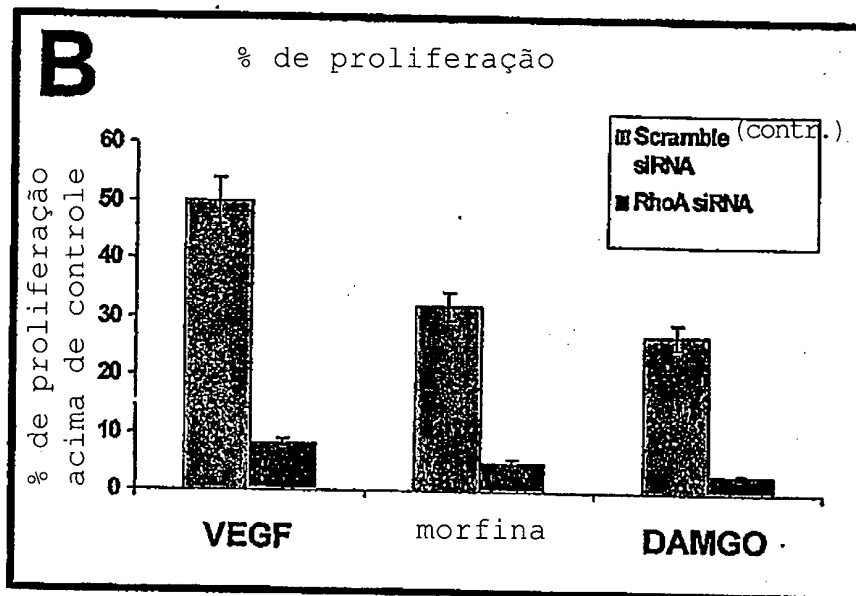


FIG.10

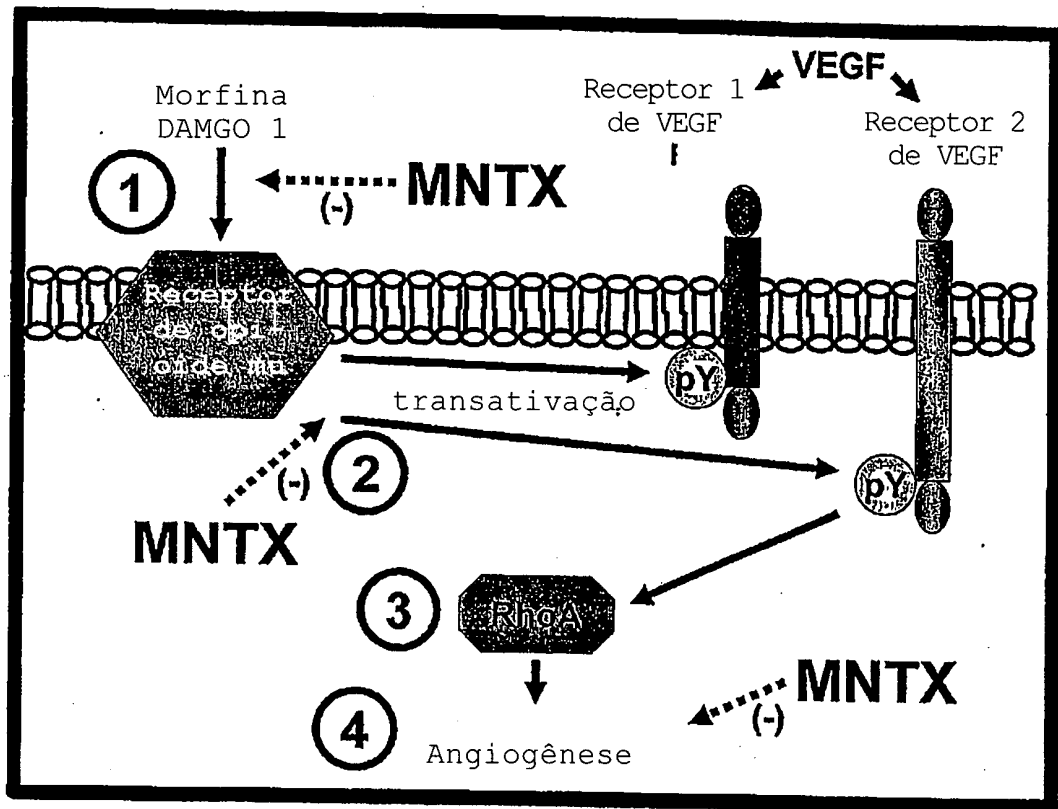
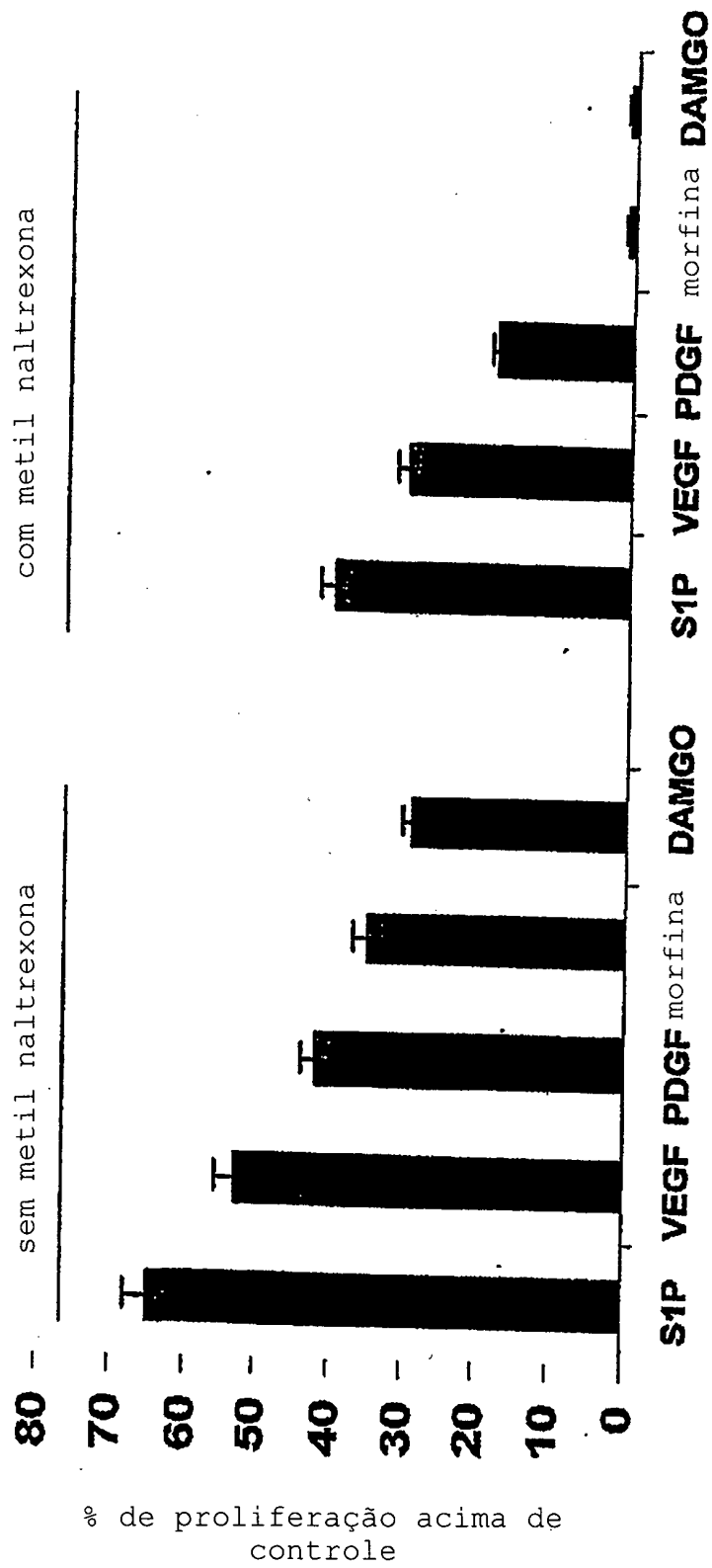


FIG.11

% de proliferação



100 nM para todos agonistas e inibidores

FIG.12

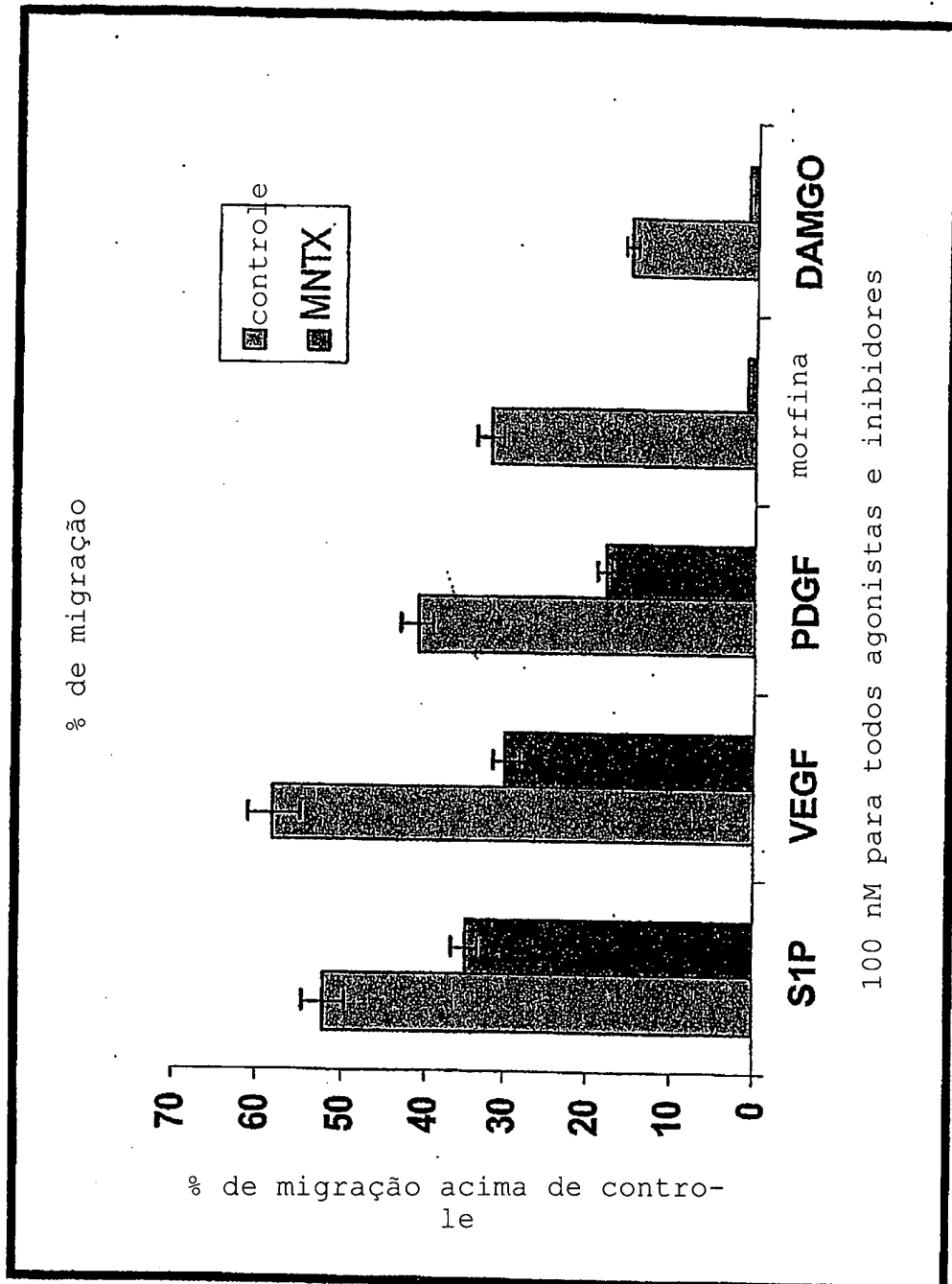


FIG.13

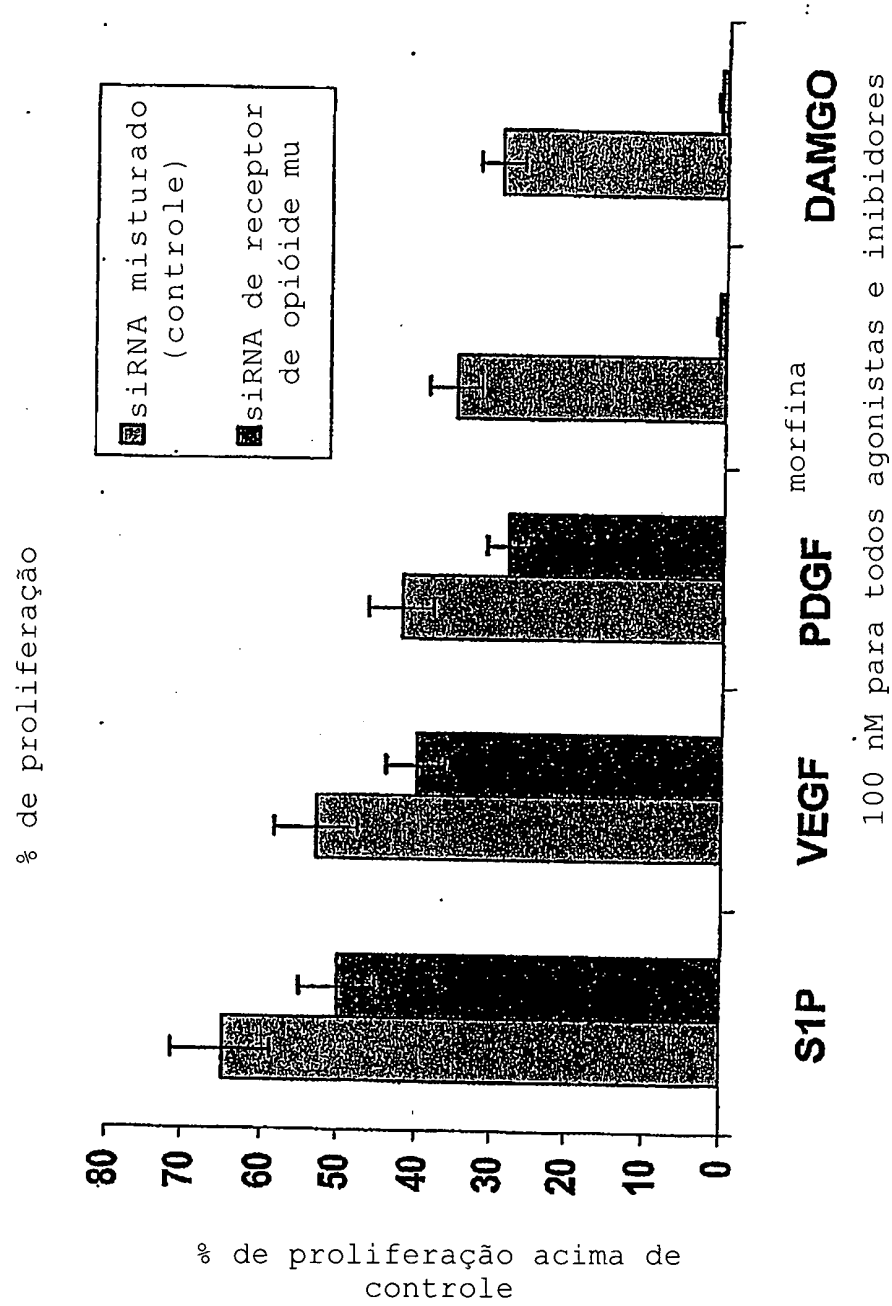
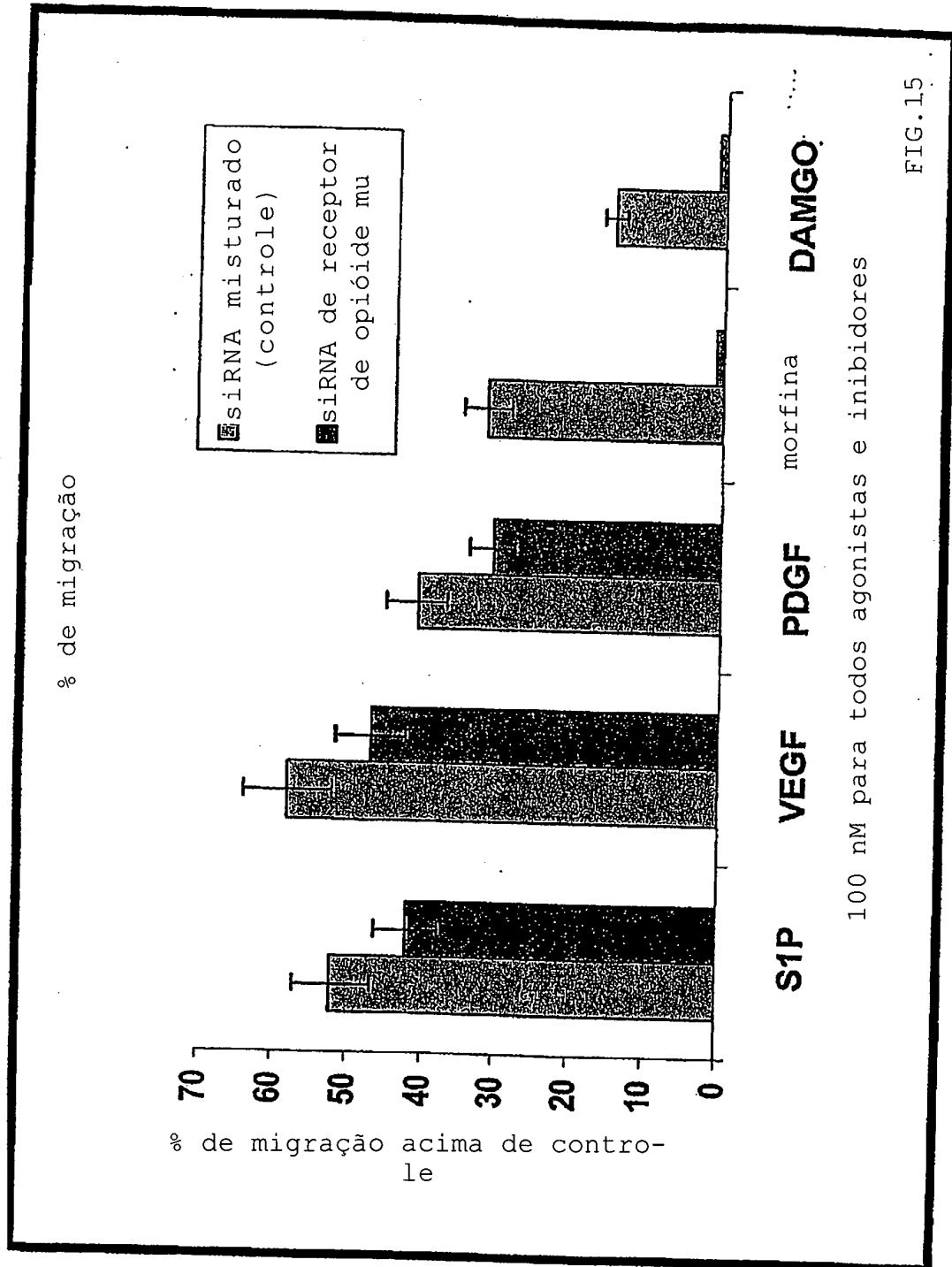


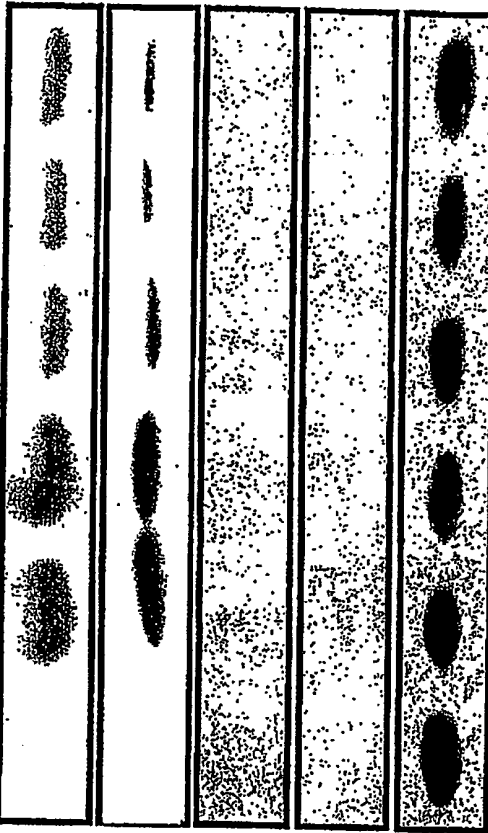
FIG.14





## Mancha Imuno:

controle morfina DAMGO S1P VEGF PDGF (5 minutos)



Ippt: receptor de opióide mu

FIG.16

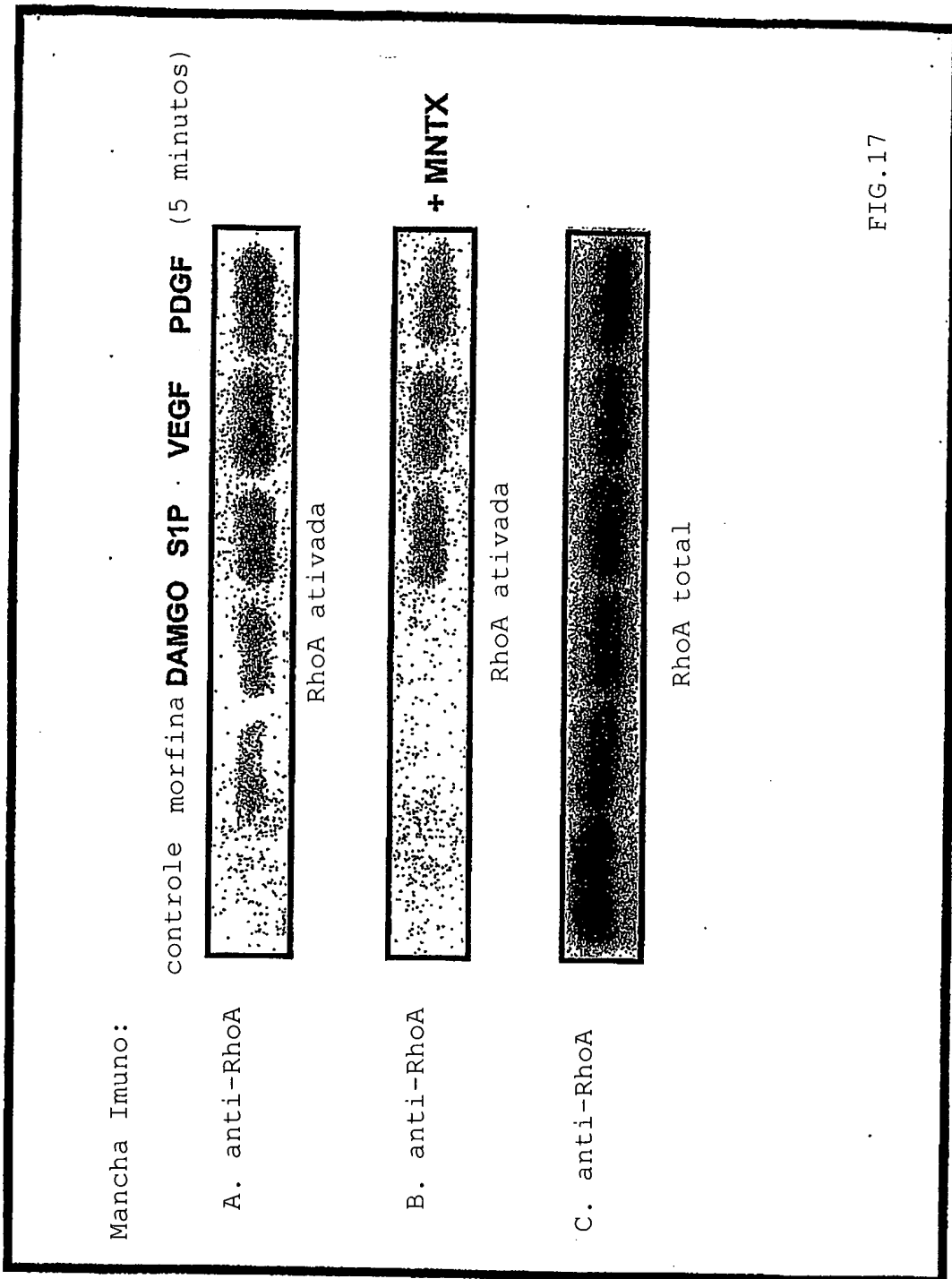
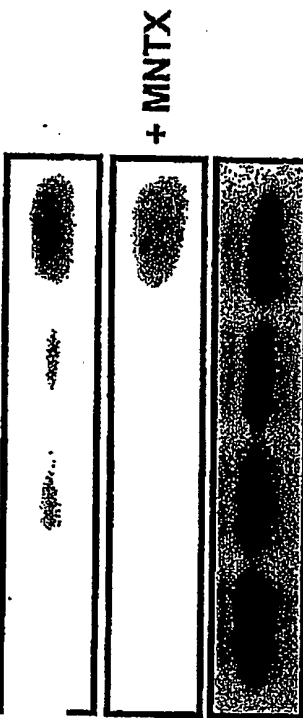


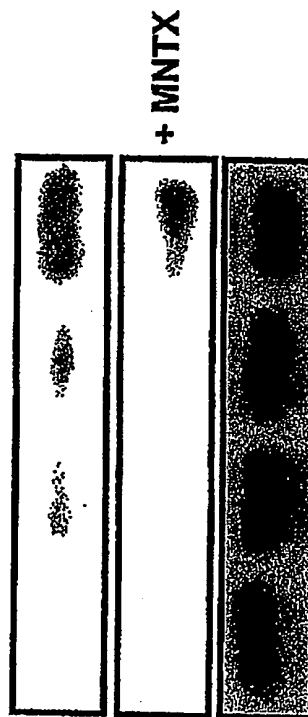
FIG.17

Mancha Imuno: controle morfina DAMGO VEGF (5 minutos)



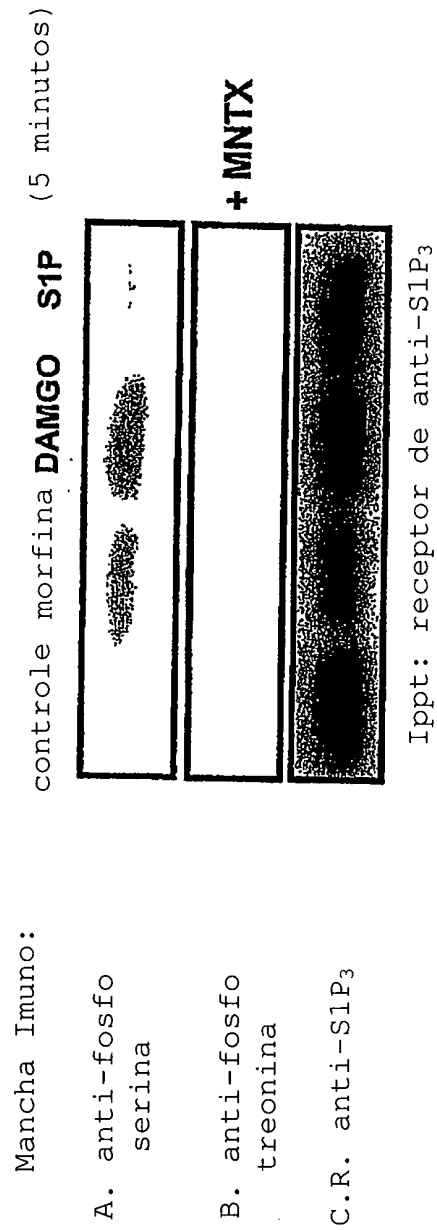
Ippt: receptor anti-VEGF

Mancha Imuno: controle morfina DAMGO PDGF (5 minutos)



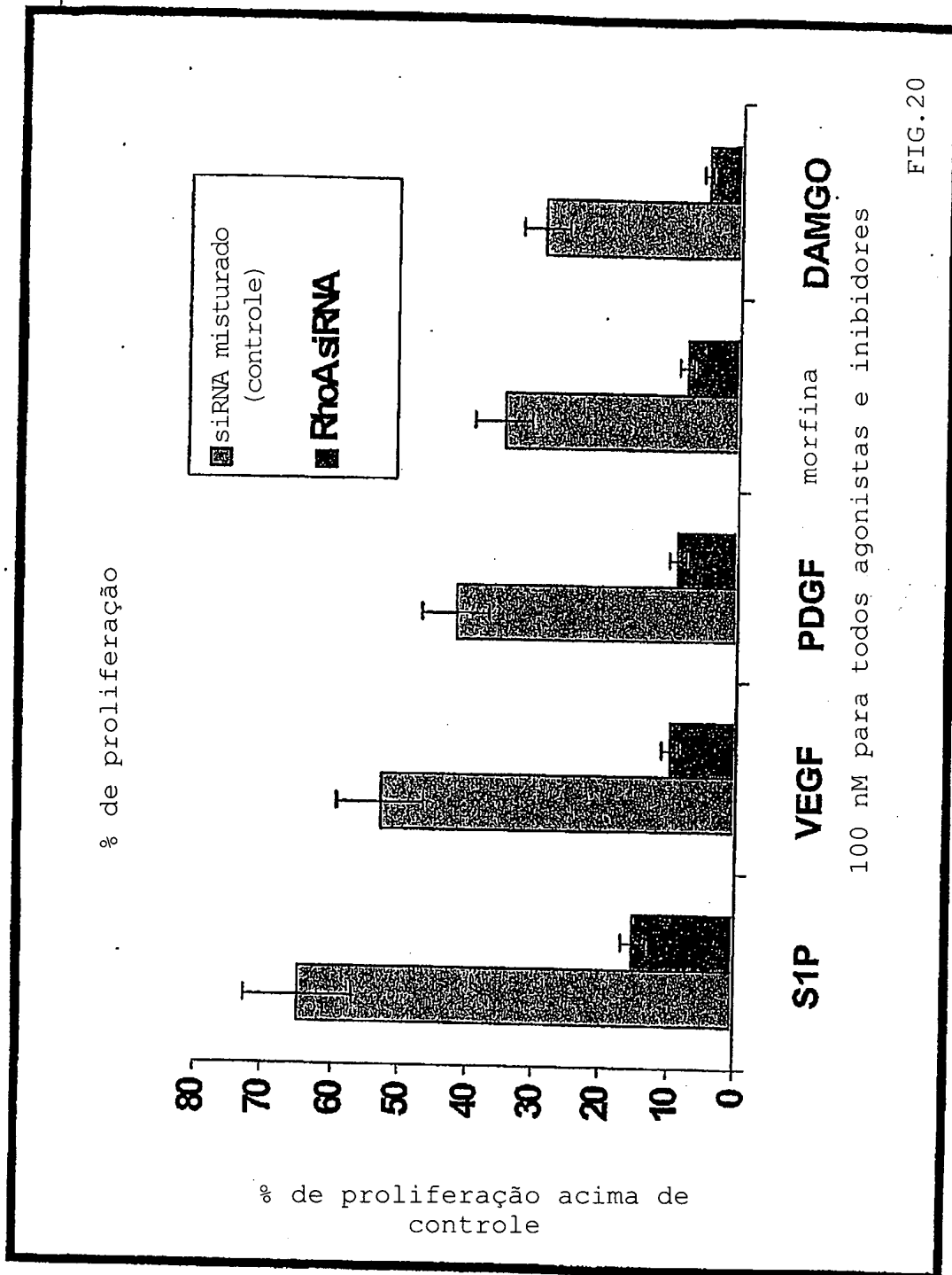
Ippt: receptor anti-PDGF

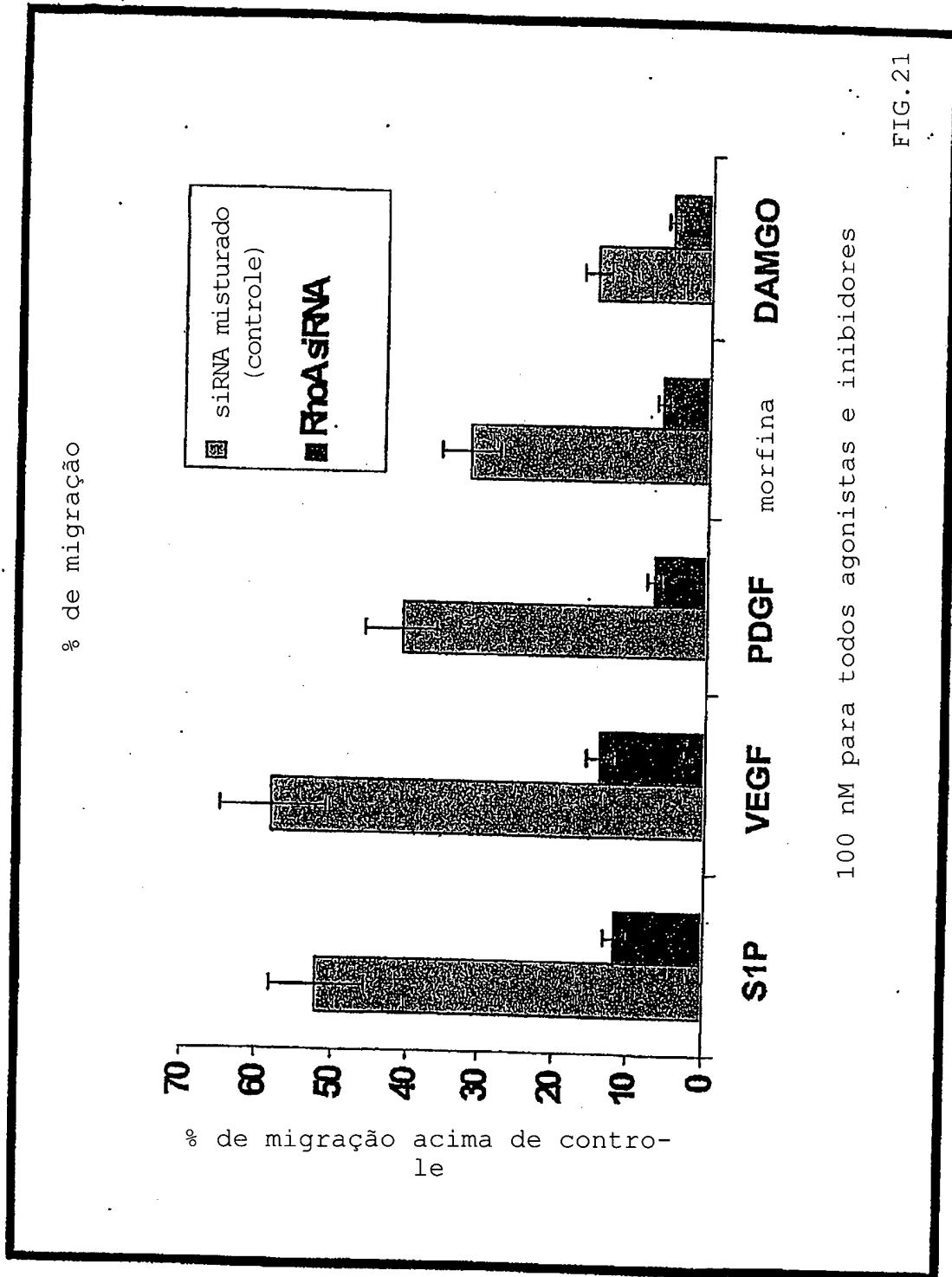
FIG.18



\*Usando S1P 100 nM, ativação de receptor de S1P<sub>1</sub> >>>

FIG. 19





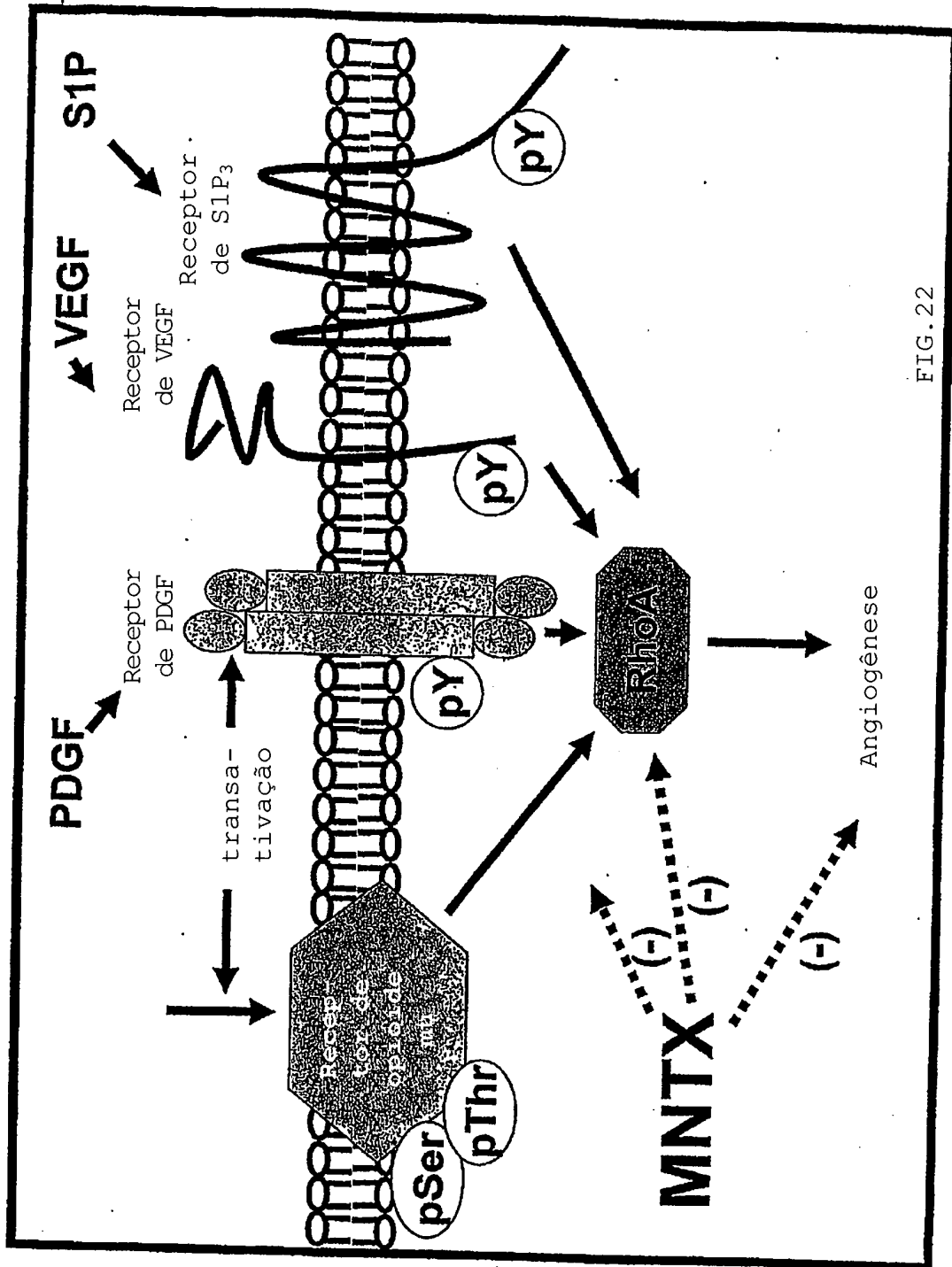


FIG. 22

P106 08/18-0

RESUMO

"USO DE ANTAGONISTAS OPIÓIDES PARA ATENUAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS"

5 A invenção provê métodos de atenuação, por exemplo, inibição ou redução, de proliferação e migração celular, particularmente proliferação e migração de célula endotelial, incluindo aquela associada com angiogênese, usando antagonistas opióides, incluindo, mas não limitado a, aqueles que são antagonistas restritos periféricamente.