



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

(21) BR 102019013454-2 A2



(22) Data do Depósito: 27/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 05/01/2021

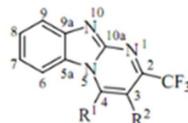
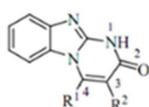
(54) Título: USO DE COMPOSTO DERIVADO DE PIRIMIDOBENZIMIDAZOL

(51) Int. Cl.: C07D 487/04; A61K 31/519; A61P 35/00.

(71) Depositante(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM.

(72) Inventor(es): MÁRCIA ROSÂNGELA WINK; JÉSSICA GONÇALVES AZEVEDO; GUIDO LENZ; NILO ZANATTA; SIMONE SCHNEIDER AMARAL.

(57) Resumo: USO DE COMPOSTO DERIVADO DE PIRIMIDOBENZIMIDAZOL A presente invenção descreve o uso de compostos derivados de pirimidobenzimidazol para preparar de um medicamento para tratar câncer, e mais especificamente o uso do composto para preparar um medicamento para o tratamento de melanoma. Mais especificamente, o composto é selecionado do grupo consistindo de 4-fenil-pirimido[1,2-a]benzimidazol-2(1H)-ona; 4-(3-hidroxipropil)pirimido[1,2-a]benzimidazol-2(1H)-ona; 2,3,4,3a,5,11a-hexaedro-4-oxo-furano[2,3;6,5]pirimido[1,2-a]benzimidazol; pirimido[1,2-a]benzimidazol-2(1H)-ona; 4-metil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-a]benzimidazol; 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-a]benzimidazol e 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-a]benzimidazol. A presente invenção se situa nos campos da química, farmácia e medicina.



Compostos	R ¹	R ²	Compostos	R ¹	R ²
PBZ 01	Ph	H	PBZ 05	Me	H
PBZ 02	H	-(CH ₂) ₃ -	PBZ 06	H	H
PBZ 03	H	-(CH ₂) ₂ -	PBZ 07	Ph	H
PBZ 03'	O	-(CH ₂) ₂ -			
PBZ 04	H	H			

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

USO DE COMPOSTO DERIVADO DE PIRIMIDOBENZIMIDAZOL

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve o uso de compostos derivados de pirimidobenzimidazol para preparação de um medicamento para o tratamento de câncer. A presente invenção se situa nos campos da química, farmácia e medicina.

Antecedentes da Invenção

[0002] No Brasil, o câncer de pele corresponde a 30% dos tumores, sendo que dentre estes, o melanoma, neoplasia maligna originada dos melanócitos, é o mais frequente na Região Sul do país. Todavia, apesar de o melanoma possuir uma incidência de apenas 3%, características como elevada capacidade de formar metástases e resistência às terapias usuais, o caracterizam como de mau prognóstico, sendo responsáveis pelas elevadas taxas de mortalidade. Até o presente momento, as opções de tratamentos disponíveis são cirurgia (para estágios iniciais), quimioterapia, imunoterapia, e radioterapia, sendo que a quimioterapia não se mostra eficaz para melanomas em estágios avançados.

Melanomas

[0003] O câncer engloba um grupo de doenças onde se tem um crescimento descontrolado de algumas células anormais, que, caso não tenha um controle efetivo por sua propagação, pode acarretar a morte (American Cancer Society, 2014). É considerado mundialmente um problema de saúde pública por acometer um número elevado de pessoas e, inclusive, por causar um grande número de mortes (Shaharyar et al., 2010).

[0004] O câncer de pele é o tipo de câncer que mais acomete a população mundial (Brasil, 2014; American Cancer Society, 2015). Dentre os tipos de câncer de pele existentes o melanoma é aquele que se apresenta de uma forma mais agressiva e, quando chega a fase de metástases, adquire um perfil

considerado como prognóstico sombrio (Tentori et al., 2013).

[0005] De acordo com o Instituto Nacional de Câncer, as estimativas de novos casos de câncer no Brasil pairam em torno de 600 mil casos: 6.260 casos de melanoma, sendo que 2.920 foram em homens e 3.340 em mulheres (Brasil, 2018). Dentre essa população, as taxas mais elevadas são estimadas para o Sul do Brasil, provavelmente, devido à origem européia dos colonizadores (Battisti et al., 2009; Fauri et al., 2010).

[0006] Apesar de representar apenas 3% dos casos de câncer de pele, o melanoma é responsável pela maioria das mortes por malignidades cutâneas, uma vez que possui alto potencial de enviar metástases a órgãos distantes (Nakayama, 2010; Koprowska e Czyz, 2011) e pela baixa sobrevida dos acometidos, sendo esta considerada com uma mediana global de 8 a 18 meses (Finn et al., 2012; Velho, 2012; Tentori et al., 2013; Rastrelli et al., 2014).

Estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento dos melanomas

[0007] O melanoma cutâneo é notoriamente conhecido como uma das neoplasias mais difíceis de tratar por apresentar-se com elevada resistência às terapias usuais (De Souza et al., 2012; Garbe et al., 2012; Robert et al., 2013), com taxas de respostas, na maioria dos tratamentos, não superior a 25 % (Hocker et al., 2008).

[0008] O tratamento para melanoma depende de diversos fatores como, por exemplo, o estágio ao qual se encontra o câncer, sendo definido após a sua confirmação histopatológica (American Cancer Society, 2013). Portanto, as opções de tratamento disponíveis, até o momento, incluem cirurgia - para estágios iniciais -, quimioterapia, imunoterapia, e radioterapia. Entretanto, apesar de muitas vezes utilizar-se a quimioterapia para melanomas em estágios mais avançados, sabe-se que esta não se mostra eficaz, porém, por causa do alívio dos sintomas e do prolongamento, em alguns casos, da vida dos pacientes, seu uso é justificado (Garbe et al., 2012).

[0009] Até março de 2011, nos Estados Unidos, apenas dois fármacos eram liberados para uso, aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), a

interleucina 2 (IL-2), medicamento de terapia adjuvante, e a dacarbazina, agente de alquilação (Ko e Fisher, 2011; Chandra e Pavlick, 2012). A dacarbazina, até o presente momento, ainda continua sendo o único agente quimioterápico aprovado mesmo apresentando uma taxa de remissão baixa, entre 5% e 15%, quando administrada como agente único. Apesar dessa baixa eficácia, a dacarbazina representa o tratamento de referência de melanoma metastático e é escolhida como braço de tratamento em numerosos ensaios clínicos (Eigentler et al., 2011; Garbe et al., 2012).

[0010] Ainda no ano de 2011, dois novos agentes foram aprovados pela FDA: o ipilimumab, uma imunoterapia com anticorpos monoclonais que estimulam os linfócitos T e que, devido a sua ação, podem estar associados à imunoreações; e o vemurafenib, um tratamento alvo para a mutações BRAFV600E, encontrada em aproximadamente 60% dos pacientes com melanoma, aumentando, deste modo, as opções para tentativa de tratamento (Chandra e Pavlick, 2012). Apesar deste apresentar um alto potencial biológico, a resistência é adquirida na maioria dos pacientes tratados, talvez devido a heterogeneidade dos tumores, onde uma pequena parcela de células tumorais é resistente à intervenção terapêutica. Com isto culminando a aquisição da quimiorresistência plena, a qual costuma ocorrer após 3 a 6 meses (Kudchadkar et al., 2013). No Brasil, segundo a PORTARIA Nº 357, DE 8 DE ABRIL DE 2013, a recomendação para o tratamento é que seja dada preferência como primeira linha de tratamento sistêmico a dacarbazina (Brasil, 2013).

[0011] Dessa maneira, sabe-se que atualmente, nenhum tratamento para melanoma metastático tem um significativo impacto na sobrevida do paciente, já que os benefícios da terapêutica são mínimos, evidenciando a urgência de novas estratégias terapêuticas eficazes (Soengas e Lowe, 2003; Ko e Fisher, 2011).

[0012] O documento "Synthesis and Characterization of Some Novel 2-(trifluoromethyl)-pyrimido [1,2-a] benzimidazoles and Pyrimido [1,2-a]

benzimidazol-2(1H)-ones of Biological Interest de Nilo Zanatta, Simone S. Amaral, Andressa Esteves-Souza et al., publicado na revista Synthesis em 2006 revela a síntese de potenciais ativos 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-a]benzimidazóis e pirimido[1,2-a]benzimidazol-2(1H)-ona a partir de reações de ciclocondensação entre 4-alcoxivinil-trifluor(cloro)metil cetonas com o 2-aminobenzimidazol. Os autores sugeriram que esses compostos tinham atividade de inibição sobre a enzima Topoisomerase I. Diferentemente da presente invenção, o documento não realiza testes sobre a inibição do crescimento de células tumorais cancerígenas nos compostos obtidos e caracterizados.

[0013] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0014] Em resumo, há uma grande necessidade de terapias mais eficazes para o tratamento de melanoma e, não há no Estado da técnica, relatos da ação antitumoral dos derivados pirimidobenzimidazóis (PBZs) como os apresentados na presente invenção.

Sumário da Invenção

[0015] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de derivados de pirimidobenzimidazóis (PBZs) para o tratamento de câncer. Mais especificamente, para o tratamento de melanoma, tendo em vista a falta de alternativas terapêuticas eficazes para o tratamento do melanoma, a presente invenção apresenta uma série de pirimido[1,2-a]benzimidazóis com ação antitumoral em linhagens de melanoma de diferentes graus de malignidade.

[0016] Compostos heterocíclicos são importantes quando se trata de agentes com efeitos antitumorais, principalmente porque estes acabam sendo uma chave para a formação de uma variedade de compostos que acabam tendo um papel crucial nas funções de moléculas biologicamente importantes (Yeong et

al., 2014). Dentre eles pode-se citar os benzimidazóis e as imidazopirimidinas, os quais possuem importantes e conhecidas propriedades farmacológicas (Dalla Via et al., 2001) como: anticâncer, antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, dentre outras (Hranjec et al., 2010; Abu-Bakr et al., 2012).

[0017] Referente a isso, as imidazo[1,2-a]pirimidinas e os pirimido[1,2-a]benzimidazóis, derivados dessa classe de heterocíclicos de interesse farmacêutico, possuem em sua estrutura ao menos dois anéis fundidos, onde o anel heterocíclico composto por cinco elementos é um imidazol e o anel heterocíclico composto por seis é uma pirimidina (Amaral, 2005). (Zanatta et al., 2006) sintetizou uma série de novos 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-a]benzimidazóis e pirimido[1,2-a]benzimidazol-2(1H)-ona a partir de reações de ciclocondensação entre 4-alcovivinil-trifluor(cloro)metil cetonas com o 2-aminobenzimidazol e procedeu testes para avaliar a possível atividade inibitória destes perante a enzima DNA-topoisomerase-I. O interesse nesta enzima reside no fato de que compostos que conseguem inibi-la são reportados como de importância clínica para tratamentos, como por exemplo, antitumorais (Pommier, 2006). Após a exposição enzima-compostos, os pesquisadores observaram um efeito inibitório significativo de todos os compostos em teste, indicando, com isso, um potencial efeito desta classe (Zanatta et al., 2006), portanto, estes sete compostos testados por Zanatta et al. (2006) (Figura 1) foram utilizados na presente invenção.

[0018] O melanoma, tumor maligno com alto poder metastático tem sido alvo de diversas pesquisas voltadas a descobertas de novas terapias. Visto que, até o momento, não se dispõe de um tratamento que garanta um significativo impacto na sobrevivência das pessoas acometidas, sendo apenas a ressecção cirúrgica, em estágios bem iniciais, a garantia de uma possível cura. Portanto, devido à baixa eficácia dos tratamentos em uso, bem como a sua característica de resistência aos tratamentos atuais, como a dacarbazina, faz-se necessário a descoberta de novas estratégias terapêuticas. Além disso, até onde se conhece, os novos compostos sintetizados por Zanatta et al.(2006) (série de 2-

(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazóis e as pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona) não foram testados em linhagens tumorais. Portanto, devido à baixa eficácia dos tratamentos em uso bem como a possibilidade de resistência aos tratamentos, característica bem importante do melanoma, e até mesmo devido à escassa análise da possível ação antitumoral destes compostos, faz-se necessário a pesquisa e descoberta do efeito dessas possíveis novas drogas antitumorais, oportunizando, assim, maiores benefícios terapêuticos, além de permitir uma melhora na sobrevivência dos pacientes.

[0019] Em um primeiro objeto, a presente invenção define o uso de composto derivado de pirimidobenzimidazol sendo para preparar um medicamento para tratar câncer.

[0020] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos em detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0021] São apresentadas as seguintes figuras:

[0022] A Figura 1 mostra os compostos da presente invenção. (PBZ 01) 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; (PBZ 02) 4-(3-hidroxipropil)pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; (PBZ 03) 2,3,4,3a,5,11a-hexaedro-4-oxofurano[2',3';6,5]pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; (PBZ 04) pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; (PBZ 05) 4-metil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; (PBZ 06) 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; (PBZ 07) 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol. *Composto formado pela junção destes substituintes.

[0023] A Figura 2 mostra uma comparação sobre a inibição da viabilidade celular dos PBZs para ambas as linhagens (A) SK-Mel-103 e (B) SK-Mel-28.

[0024] A Figura 3 mostra o efeito dos sete PBZs na viabilidade celular analisados através do ensaio MTT com as concentrações propostas de 0,3; 1,0; 3,0 e 10 µM no estudo de fase aguda sobre a linhagem SK-Mel-103.

[0025] A Figura 4 o efeito dos sete PBZs na viabilidade celular analisados através do ensaio MTT com as concentrações propostas de 20; 50 e 100 µM

no estudo de fase aguda sobre a linhagem SK-Mel-103.

[0026] A Figura 5 mostra o efeito dos sete PBZs na viabilidade celular analisado através do ensaio MTT com as concentrações propostas de 0,3; 1,0; 3,0 e 10 μM no estudo de fase aguda sobre a linhagem SK-Mel-28.

[0027] A Figura 6 mostra efeito dos sete PBZs na viabilidade celular analisado através do ensaio MTT com as concentrações propostas de 20; 50 e 100 μM no estudo de fase aguda sobre a linhagem SK-Mel-28.

[0028] A Figura 7 mostra o efeito dose resposta dos compostos em fase crônica e valor de IC_{50} (inibição de 50% da viabilidade celular) sendo que os gráficos encontram-se em escala logarítmica da concentração dos compostos.

[0029] A Figura 8 mostra o efeito dos PBZs em fase crônica, 120 horas de tratamento, comparado com a Dacarbazina perante a célula controle Melanócito.

[0030] A Figura 9 mostra o efeito dos PBZs em relação ao processo de autofagia. Pode-se notar que os compostos causam um aumento deste processo celular em relação ao controle, sugerindo-se que os PBZs podem estar ativando esta via celular como mecanismo.

[0031] A Figura 10 mostra o teste de apoptose no qual células Anexina-V positivas foram avaliadas demonstrando um aumento das mesmas com os tratamentos em comparação ao controle.

[0032] A Figura 11 comparação do volume tumoral nos camundongos durante o ciclo de tratamento. Os animais foram tratados durante 5 dias e o volume tumoral foi analisado em dias específicos até o final do ciclo.

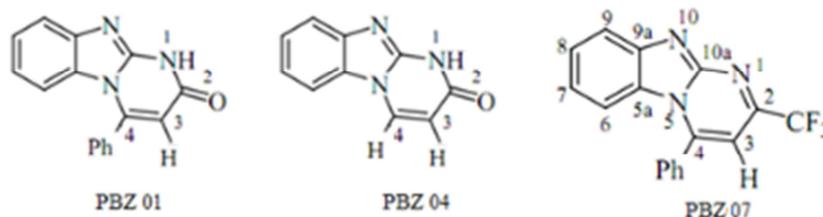
[0033] A Figura 12 mostra Duplicação cumulativa da população celular ao longo do tempo ("*Cumulative population doubling*"). As células de melanoma humano foram tratadas por 5 dias e acompanhadas durante um ciclo de tratamento sendo realizadas contagens do número de células em tempos específicos. (A) SK-Mel-103 (B) SK-Mel-28. * diferença estatística em relação ao controle * diferença estatística em relação a DTIC. $P < 0.05$.

[0034] A Figura 13 mostra os resultados obtidos nas análises de toxicidade em

órgãos distantes onde a abordagem realizada do protocolo de terapia não foi tóxica para os órgãos dos animais.

Descrição Detalhada da Invenção

[0035] A presente invenção descreve o uso de compostos derivados de pirimidobenzimidazóis com uma ação quimioterápica, especificamente com contra linhagens de melanoma. Os testes foram realizados com 7 compostos PBZs (Figura 1), destacando-se como os melhores os derivados PBZ01, PBZ 04 e PBZ 07 intitulados, respectivamente, 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona, pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona e 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol e que apresentam as estruturas apresentadas abaixo



[0036] Em um primeiro objeto, a presente invenção define o uso de composto derivado de pirimidobenzimidazol sendo para preparar um medicamento para tratar câncer.

[0037] Em uma concretização do uso, o dito câncer é melanoma.

[0038] Em uma concretização do uso, o dito composto derivado de pirimidobenzimidazol é selecionado do grupo consistindo de 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 4-(3-hidroxipropil)pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 2,3,4,3a,5,11a-hexaedro-4-oxo-furano[2',3';6,5]pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 4-metil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol e 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol.

[0039] Em uma concretização do uso, o dito composto derivado de pirimidobenzimidazol é selecionado do grupo consistindo de 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona, pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona e

4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol.

[0040] Em uma concretização do uso, o composto derivado de pirimidobenzimidazol é 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona.

[0041] Em uma concretização do uso, o dito composto derivado de pirimidobenzimidazol é pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona.

[0042] Em uma concretização do uso do composto, o dito composto derivado de pirimidobenzimidazol é 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol.

[0043] Em uma concretização do uso, o dito medicamento compreende administração por via intravenosa.

[0044] Os compostos da presente invenção são benéficos para o tratamento de melanoma, conforme testes apresentados a seguir.

Exemplos

[0045] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

[0046] Dentre os sete compostos testados, três apresentaram maior efeito sobre a inibição da viabilidade celular perante os demais para ambas as linhagens (A) SK-Mel-103 e (B) SK-Mel-28 conforme pode ser visto na figura 2.

Cultivo das linhagens de melanomas e melanócitos

[0047] As linhagens escolhidas para esse estudo foram as já utilizadas anteriormente, nos estudos preliminares, as que apresentam diferentes composições das proteínas APAF-1 (Via intrínseca) e Caspase 8 (via extrínseca), envolvidas nos processos de morte por apoptose, o que permitiu fazer correlações com os experimentos que avaliam o tipo de morte celular. Ainda, foi utilizada a linhagem de melanoma murino, B16F10, para o modelo *in vivo*. Todas as linhagens de melanoma foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM- High glucose) suplementado com 10% SFB e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Linhagem	APAF-1	Caspase 8	Fenótipo
----------	--------	-----------	----------

SK-Mel-103	-	+	+ agressivo
SK-Mel-28	- / +	++	- agressivo

[0048] Os melanócitos utilizados na presente invenção foram gentilmente cedidos pela colaboradora Silvy S. M. Engler. A metodologia para este cultivo é idêntica à utilizada acima, havendo alteração apenas no meio de cultura que será o 254 CF (Cascade Biologics), meio basal para a cultura *in vitro* de melanócito normal epidermal humano, acrescido de HMGS (Cascade Biologics), suplemento de crescimento humano de melanócito.

Efeito do tratamento crônico – *in vitro*

Ensaio do MTT

[0049] A viabilidade celular dos melanomas humanos bem como dos melanócitos foram investigadas pelo ensaio do MTT em fase aguda (72 horas) e fase crônica (120 horas). As células foram tratadas e plaqueadas sobre placa de 96 poços, cultivadas e incubadas por 3,5 h a 37°C em solução de MTT (0,5 mg/ml de MTT dissolvido em tampão livre de Ca²⁺ e Mg²⁺). Cristais de Formazan formados pela clivagem do tetrazolium foram dissolvidos com 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e quantificados a 560 nm por espectrofotômetro.

[0050] No ensaio MTT com todas as concentrações propostas no estudo de fase aguda sobre a linhagem SK-Mel-103, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na quantidade de 1x10³ células/poço, tratadas após a adesão na superfície, e, analisadas 72 horas pós-tratamento pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT. Os valores mostrados, nas figuras 3 e 4, indicam a média ± D.P. de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por ANOVA de uma via complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Sendo que **(A)** indica a comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 0,3 µM; **(B)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 1 µM; **(C)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 3 µM; **(D)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 10 µM; **(E)**

comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 20 μM ; **(F)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 50 μM ; **(G)** Comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 100 μM .

[0051] No ensaio MTT com todas as concentrações propostas no estudo de fase aguda sobre a linhagem SK-Mel-28, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na quantidade de 1×10^3 células/poço, tratadas após a adesão na superfície, e, analisadas 72 horas pós-tratamento pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT. Os valores mostrados, nas figuras 5 e 6, indicam a média \pm D.P. de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por ANOVA de uma via complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Sendo que **(A)** indica a comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 0,3 μM ; **(B)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 1 μM ; **(C)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 3 μM ; **(D)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 10 μM ; **(E)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 20 μM ; **(F)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 50 μM ; **(G)** comparação entre os sete PBZs na concentração de tratamento 100 μM .

[0052] O efeito dose resposta dos compostos em fase crônica e valor de IC_{50} (inibição de 50% da viabilidade celular) foi avaliado pelo plaqueamento das células em placas de 96 poços tratadas com os PBZs e a viabilidade celular foi aferida após 120 horas de tratamento. Os valores mostrados indicam a média \pm D.P. de três experimentos independentes em triplicatas. Os gráficos demonstram os valores das concentrações em logarítimo onde o efeito de dose-resposta da SK-Mel-28 com (A) PBZ 01 e (B) PBZ 04, e da SK-Mel-103 com (C) PBZ 01 e (D) PBZ 04, são visualizados com o valor de IC_{50} (Figura 7).

[0053] O efeito dos PBZs em fase crônica, 120 horas de tratamento, comparado com a Dacarbazina perante a célula controle Melanócito é mostrado na Figura 8. Estes dados demonstram que os compostos PBZ01, 04 e 07 apresentaram melhores efeitos em reduzir a viabilidade celular,

comparado aos demais PBZs testados, sendo o efeito dos compostos PBZ 01 e 04 mais evidentes. Ainda, o valor de IC₅₀ dos compostos foram baixos e adequados para utilização em tratamentos, sendo menores que o valor normalmente utilizados pelo composto padrão de tratamento para melanoma Dacarbazina (56µM). Por fim, o efeito desses compostos nas células normais, melanócitos, foi baixo, o que demonstra uma segurança e uma seletividade para células tumorais.

Ensaio de Cumulative Population Doubling (CPD) e Ensaio Clonogênico

[0054] O efeito do tratamento crônico foi avaliado através do ensaio CPD e Clonogênico. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços e, após aderidas, foram tratadas durante 5 dias, com renovação do meio a cada dia, com DTIC 56 µM, PBZs com concentrações baseadas no valor de IC₅₀ obtidos com MTT em estudos anteriores, realizados com células de melanomas humanos, ou uma combinação dos mesmos. Após 5, 12, 19, 26 dias o número de células foi determinado e o CPD foi calculado como descrito em (Zamin *et al.*, 2009). Ainda, no dia 5 da contagem do CPD foi plaqueado o clonogênico, como descrito em (Franken *et al.*, 2006), de forma a se verificar a resistência das células frente ao tratamento através da capacidade de uma célula resistente se multiplicar e gerar uma colônia.

[0055] Analisando-se os efeitos no experimento de efeito crônico de duplicação da população celular ("*population doubling*"), os PBZ 01 e 04 demonstraram diminuir essa população quando comparado com a DTIC na linhagem celular de melanoma humano mais resistente SK-Mel-103 (Figura 4A) e, ao avaliar o efeito na linhagem celular SK-Mel-28 (Figura 4B), o PBZ 04 foi mais eficaz. Com isso pode-se perceber que nos ensaios *in vitro*, os compostos em teste foram eficazes mesmo que com uma concentração 5,6 vezes menor que a droga padrão DTIC. Portanto, nota-se que o efeito dos PBZs é promissor por conseguir tanto reduzir o número da população como reduzir o volume do tumor com uma concentração muito menor que a normalmente utilizada pela dacarbazina.

Investigação da morte celular

[0056] Após o tratamento com os PBZs, sozinhos ou em combinação com a DTIC, todas as células em estudo passaram pela análise do tipo de morte celular envolvido (necrose, apoptose, autofagia e senescência):

Necrose

[0057] Incorporação de iodeto de propídio (PI): As células tratadas foram expostas PI na concentração de 1 μ M e após 1, 2 ou 24h foram analisadas em citômetro de fluxo. Serão utilizadas células tratadas com 0,5% de Triton X-100 como controle positivo.

Apoptose

[0058] Ensaio da anexina: A externalização da fosfatidilserina foi determinada por ensaio com o kit “Annexin-V-FLUOS Staining Kit assay” (Roche, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As células em culturas foram tripsinizadas, incubadas a temperatura ambiente com a mistura de corantes por 10 min e analisadas em citômetro de fluxo. As células necróticas foram identificadas por marcação dupla com PI e anexina (onde as células apoptóticas são apenas anexinas positivas).

Autofagia

Marcação com laranja de acridina: As células foram incubadas com laranja de acridina (1 μ g/mL) por 15 min, tripsinizadas e crescidas em meio incolor por 24h. A razão de fluorescência emitida no canal vermelho (>650nm) foi dividida pela fluorescência do canal verde (510-530nm) e esta razão forneceu um valor relativo dos compartimentos ácidos celulares (Kanzawa et al., 2004).

Senescência

[0059] Método de coloração com a β -galactosidase (AS- β -gal): As células foram cultivadas até a semiconfluência, lavadas em PBS e fixadas em formaldeído 3% por 15min a temperatura ambiente. Após lavagem as células foram incubadas com solução de coloração SA- β -gal, contendo 1 mg/mL X-gal (Sigma), 40 mM ácido cítrico/tampão fosfato (pH 6.0), 5 mM ferrocianeto de potássio, 150 mM NaCl e 2 mM MgCl por 12–16 horas a 37°C. Os resultados

foram apresentados como a razão de células SA- β -gal positivas pela quantidade total de células contadas em pelo menos três campos de três experimentos independentes (Zamin et al., 2009).

[0060] A avaliação da morte celular, mostra que os tratamentos aumentam tanto autofagia (Figura 9) como células apoptóticas (Figura 10), porém esse aumento não é tão expressivo quanto o efeito de diminuição da viabilidade celular pelo método de MTT quanto pelo ensaio crônico de Duplicação cumulativa da população celular ao longo do tempo (“Cumulative Population Doubling”). Ou seja, neste caso ainda não está completamente elucidado a via específica de morte celular bem como o mecanismo dos compostos.

[0061] No teste de apoptose foi possível verificar as células após o tratamento demonstrando que estas apresentam um percentual de células anexina positiva maior que o controle, na linhagem SK-MEL-28 sendo esse resultado significativo. Já na linhagem SK-MEL-103 a combinação dos PBZs tem diferença significativa em relação ao controle, mas os PBZs sozinhos apresentam uma tendência de serem significativos (Figura 10).

Modelo *in vivo* - Ensaio de efetividade:

Inoculação das células de melanoma murino B16F10 em camundongos

[0062] As células B16F10 na quantidade de 5×10^5 (entre passagem 5 e 15) foram injetadas por via subcutânea na região do flanco direito em camundongos C57BL/6 (de 6 a 8 semanas). Antes do procedimento, os animais foram anestesiados com 83 mg/Kg de Ketamina e 10 mg/kg de Xilazina (injeção intraperitoneal). As implantações foram feitas com seringa e agulha de insulina nunca excedendo o volume de 100 μ L.

Tratamento

[0063] Os camundongos portadores de melanoma B16F10, após o tumor apresentar no mínimo 60-100 mm^3 (equivalente a 6 dia pós procedimento) (Zhang *et al.*, 2013), foram distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos de tratamentos :

- Controle: tratados (intraperitonealmente (I.P.)) com veículo (PBS, DMSO e

Tween 20%)

- DTIC: tratados com dacarbazina 80 mg/kg (I.P) (Zhang *et al.*, 2013) → droga padrão ouro.

- PBZ 01: tratados com PBZ01 30 mg/kg (I.P)

- PBZ 04: tratados com PBZ04 30 mg/kg (I.P)

[0064] Os PBZs foram administrados (I.P) após a obtenção da concentração ideal no estudo inicial de toxicidade 30 mg/kg. A DTIC foi administrada na quantia de 80 mg/kg (I.P) (Zhang *et al.*, 2013), sozinha ou em combinação com os PBZs, e, todos os tratamentos foram administrados diariamente durante 5 dias consecutivos conforme resolução do tratamento do paciente com melanoma no Brasil (Brasil, 2013). Nos ensaios, o número de animais por grupo foi baseado em artigos que utilizaram o mesmo modelo animal, sendo o número estipulado de 10 animais por grupo (Zhang *et al.*, 2013; Faiao-Flores *et al.*, 2015).

Evolução tumoral

[0065] O crescimento tumoral (macroscopia) foi acompanhado do 5º até o 26º dia, após o tratamento, medindo o volume da coxa através de um paquímetro digital. O tumor foi fotografado diariamente, utilizando uma câmera Sony Cyber Shot camera (Full HD 1080, 7.2 mega pixels, DSC-W120) junto a uma régua para posterior calibração. Após o vigésimo sexto dia o animal foi eutanasiado e o tumor foi extraído, fotografado e foram analisados os parâmetros histopatológicos. O volume do tumor foi calculado conforme a fórmula $V = d^2 \times D \times 0.5$, onde v = volume do tumor, d = diâmetro menor e D = diâmetro maior.

[0066] Os dados (Figura 11) demonstram que os PBZs 01 e 04 foram capazes de diminuir o volume tumoral quando comparados ao controle e a DTIC. Ao comparar com a DTIC cabe ressaltar que os PBZs tiveram seus resultados mais satisfatórios na redução do tamanho do tumor mesmo com uma concentração quase 3 vezes menor que a droga padrão ouro DTIC. Isso demonstra que os efeitos dos PBZs *in vivo* condizem com os efeitos já demonstrados *in vitro* (Figura 12).

Modelo in vivo - Ensaio de toxicidadeToxicidade dos PBZs sem e com a presença de DTIC

[0067] Essas análises foram feitas tanto no grupo com presença de melanoma (Modelo *in vivo* - Ensaio de efetividade).

Toxicidade em órgãos distantes

Os principais órgãos internos - cérebro, fígado, pulmões e rins - foram avaliados macroscopicamente em função do seu peso e possíveis metástases formadas, visíveis macroscopicamente. Ainda, foram avaliados parâmetros bioquímicos como biomarcadores hepáticos - alanina e aspartato aminotransferase, e biomarcadores renais - uréia e creatinina, através de ensaio cinético com kit específico, no sangue dos animais - coletado imediatamente antes de serem eutanasiados em tubos para análises de parâmetros bioquímicos. Os animais foram anestesiados, conforme protocolo de anestesia citado anteriormente, e o sangue para todas as análises foi coletado através de punção cardíaca, conforme descrito por (Hoff., 2000; Bronstad., 2001), após se certificar que os mesmos encontram-se anestesiados (pinça-se a pata do animal para confirmação). Após a punção, o soro foi separado através da centrifugação por 10 minutos a 2.500 rpm, aliquoteado e congelado em -20°C para análises futuras. Os testes bioquímicos foram realizados no aparelho BIOCLIN BS120, (Belo Horizonte, Brasil) sendo aferido com controles e padrões apropriados e seguindo as recomendações do fabricante (BIOCLIN, Belo Horizonte, Brasil).

Análise dos componentes sanguíneos (imunomodulação)

[0068] Amostras de sangue serão coletadas antes da eutanásia em tubos heparinizados, no mesmo momento da coleta para as análises bioquímicas, após serão determinadas através do hemograma pelo equipamento automatizado ABX Micros60 (Horiba ABX, Kyoto, Japão). A contagem diferencial será realizada através da coloração por PANÓTICO RÁPIDO LB (Laborclin) e aferida em microscopia.

Tamanho da amostra

[0069] Conforme a literatura é cientificamente aceita para experimentos com cultura de células, ensaios compostos por no mínimo três experimentos independentes (oriundos de três cultivos independentes), cada um deles em triplicata (WINK et al., 2003 e 2006). Quanto ao modelo in vivo o número de animais a serem utilizados foram baseados em estudos anteriores com o mesmo tipo celular e o mesmo modelo animal, totalizando 230 animais (Zhang et al., 2013; Faiao-Flores et al., 2015), sendo neste caso utilizado apenas os camundongos machos.

Resultados

[0070] O sangue foi coletado no dia da eutanásia, centrifugado para separação do soro e este foi utilizado para as análises dos componentes sanguíneos UREIA, CREATININA, TGO E TGP, cujos resultados são apresentados na Figura 13. Com essas análises pode-se concluir que os tratamentos não tiveram diferença significativa em comparação ao controle sem tratamento, logo, a abordagem realizada nesse protocolo de terapia não foi tóxica para os órgãos dos animais, mantendo a integridade funcional dos mesmos.

[0071] Quanto as análises histopatológicas dos órgãos, não houve alteração na estrutura dos órgãos analisados com os tratamentos, tanto macroscópica como microscópica, havendo apenas no grupo controle sem tratamento e no grupo tratado com Dacarbazina a presença de células neoplásicas no interior dos vasos do pulmão. Esses achados não foram encontrados nos demais grupos de tratamento.

[0072] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Uso de composto derivado de pirimidobenzimidazol **caracterizado** por ser para preparar um medicamento para tratar câncer.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo dito câncer ser melanoma.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo dito composto derivado de pirimidobenzimidazol ser selecionado do grupo consistindo de 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 4-(3-hidroxipropil)pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 2,3,4,3a,5,11a-hexaedro-4-oxo-furano[2',3';6,5]pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 4-metil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol e 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo dito composto derivado de pirimidobenzimidazol ser selecionado do grupo consistindo de 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona, pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona e 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol.

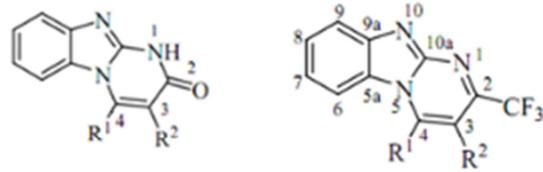
5. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo dito composto derivado de pirimidobenzimidazol ser 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo dito composto derivado de pirimidobenzimidazol ser pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo dito composto derivado de pirimidobenzimidazol ser 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo dito medicamento compreender administração por via parental e/ou enteral.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo dito medicamento compreender a administração por via intravenosa.

Figuras

Compostos	R ¹	R ²	Compostos	R ¹	R ²
PBZ 01	Ph	H	PBZ 05	Me	H
PBZ 02	H	-(CH ₂) ₃ -	PBZ 06	H	H
PBZ 03	H	-(CH ₂) ₂ -	PBZ 07	Ph	H
PBZ 03'	O	-(CH ₂) ₂ -			
PBZ 04	H	H			

Figura 1

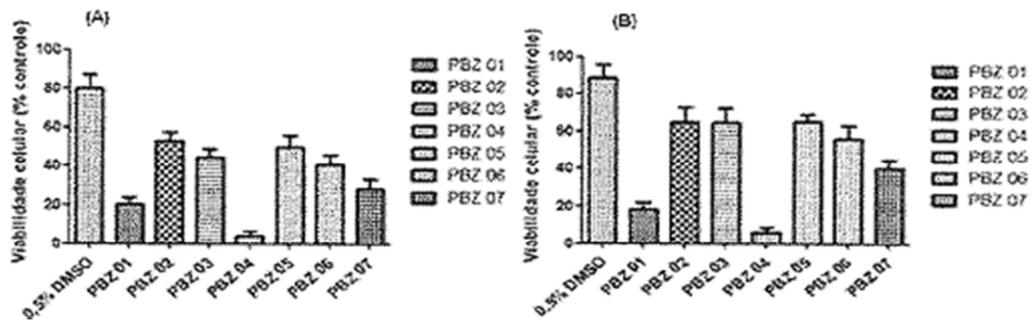


Figura 2

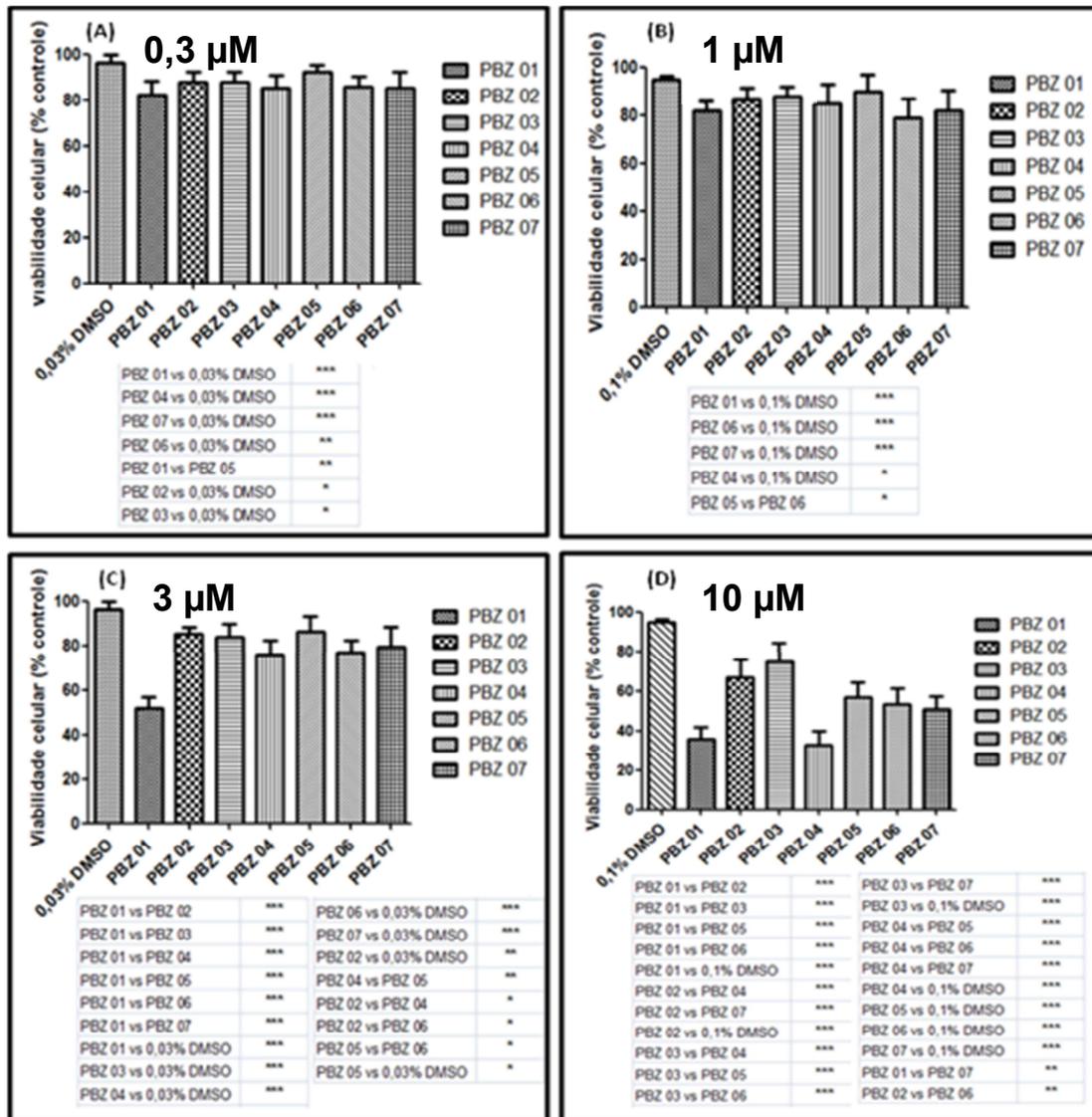


Figura 3

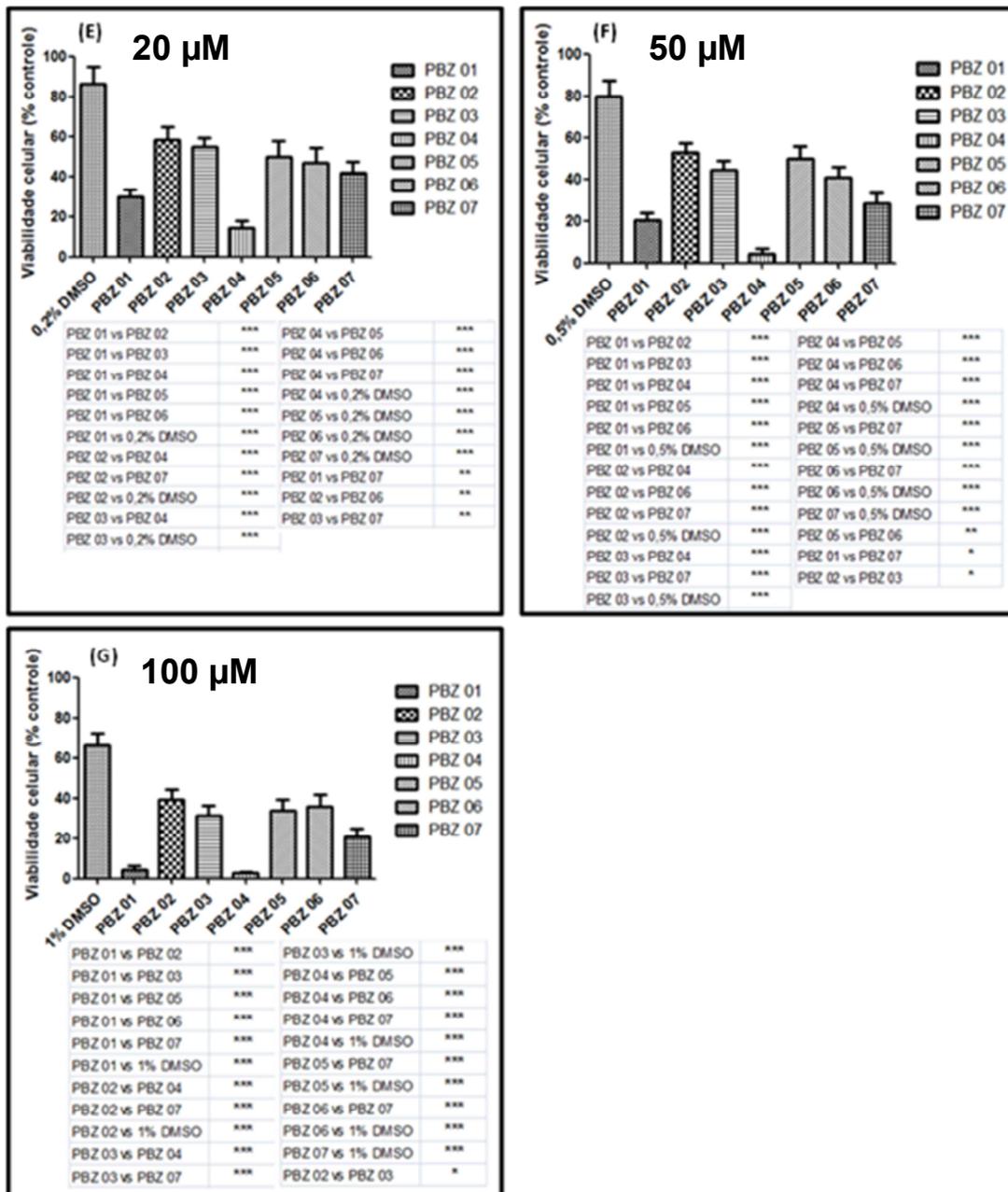


Figura 4

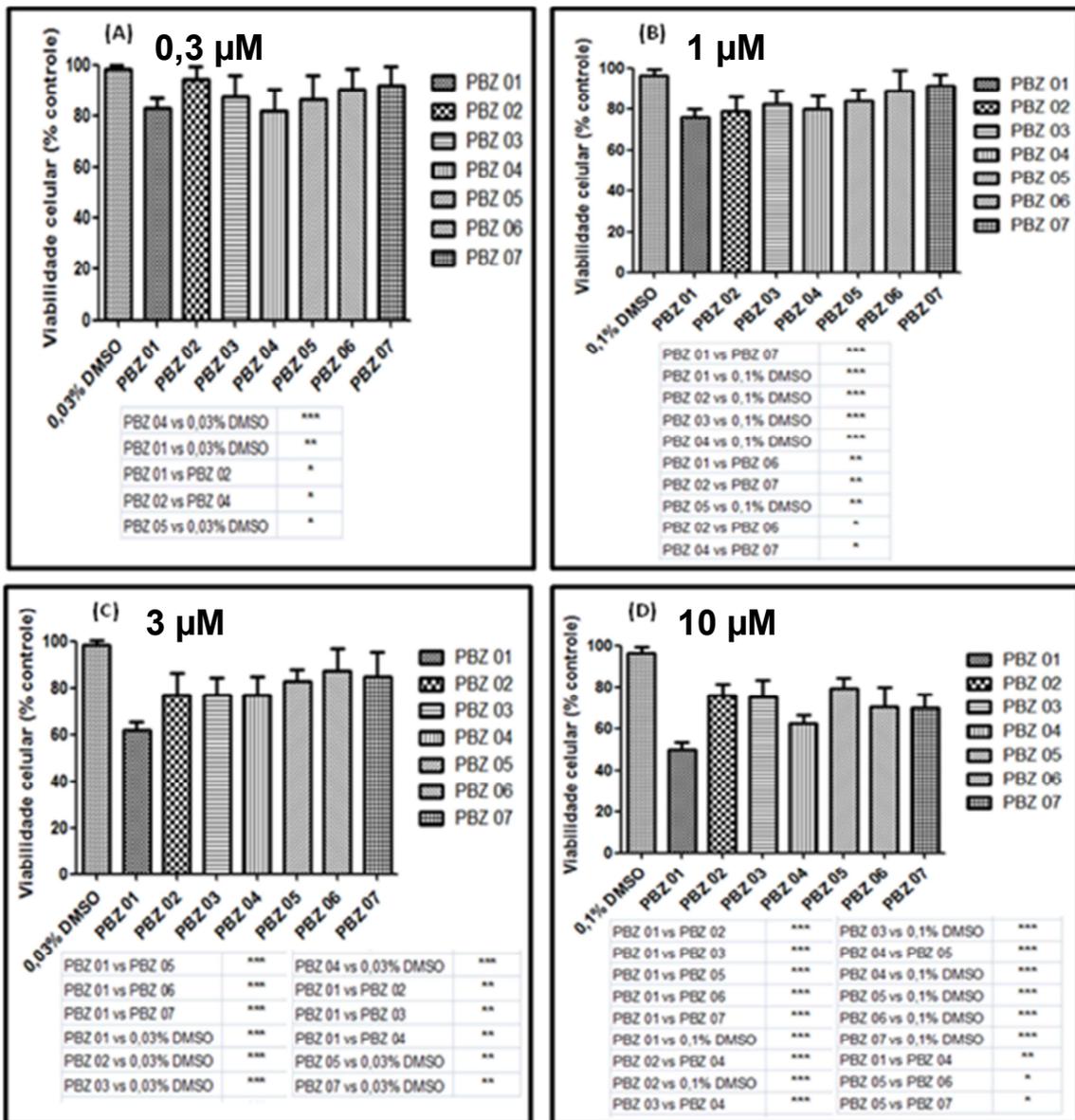


Figura 5

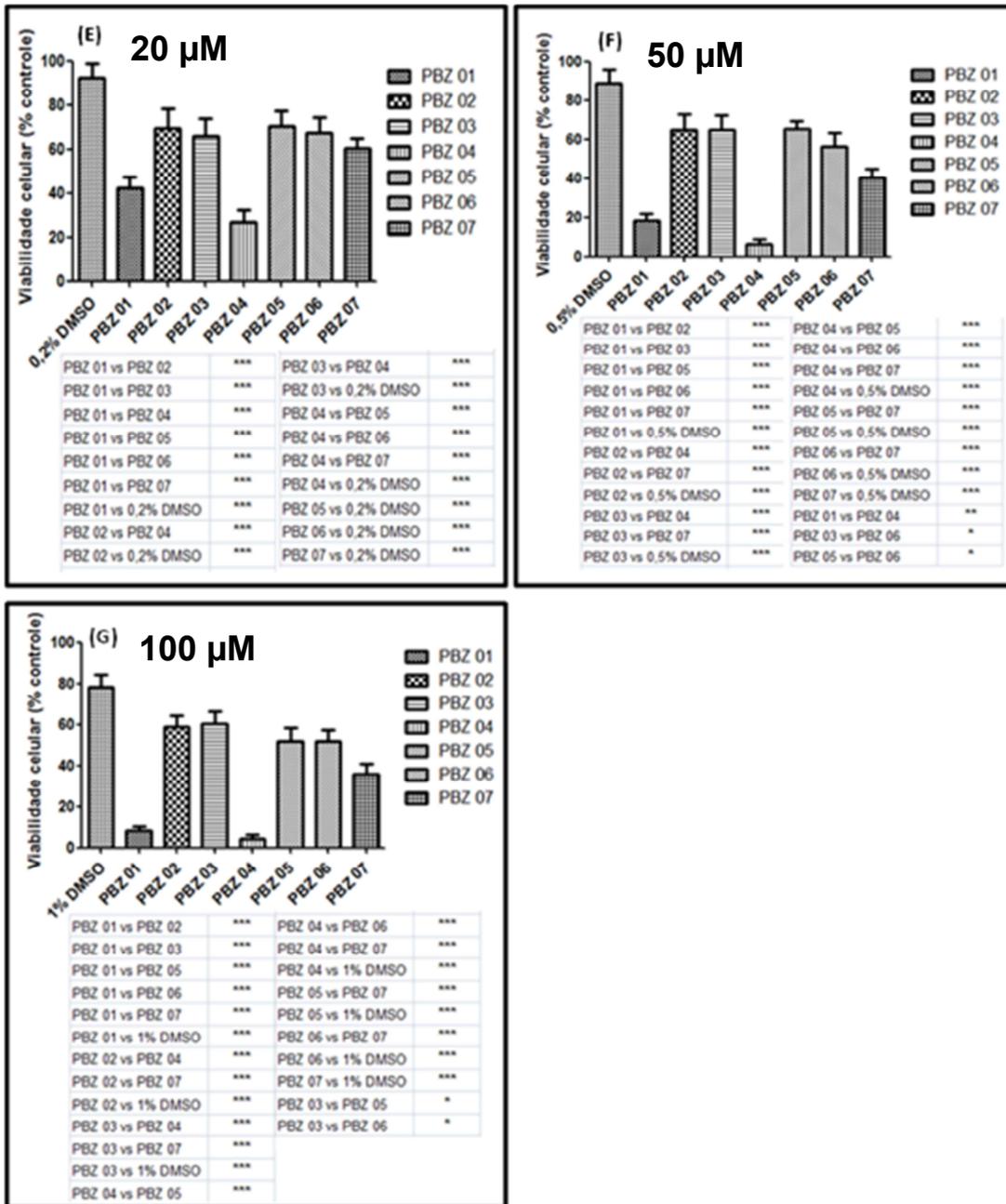


Figura 6

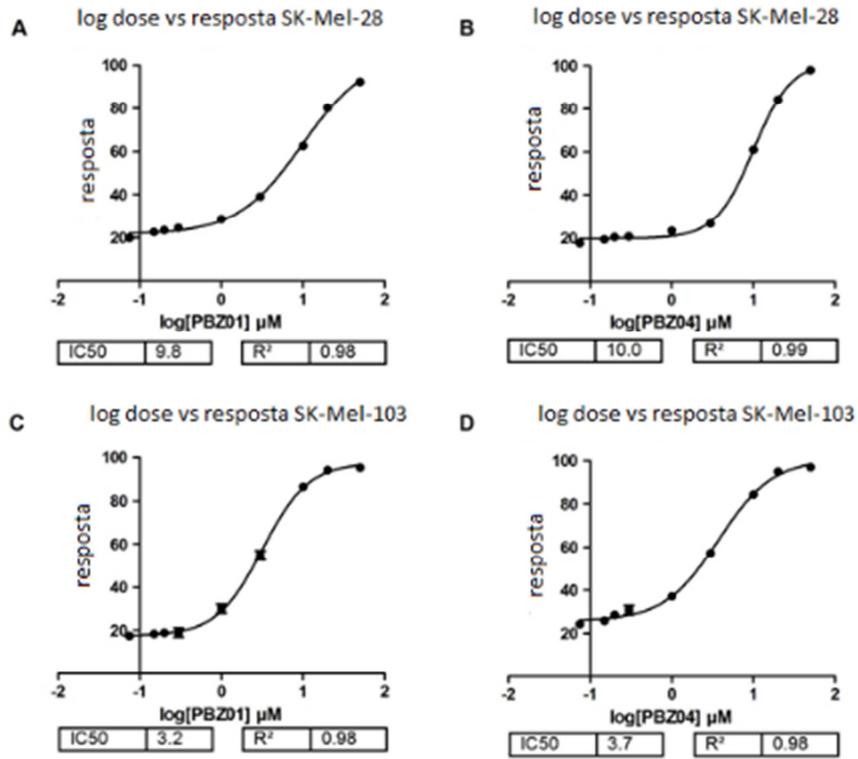


Figura 7

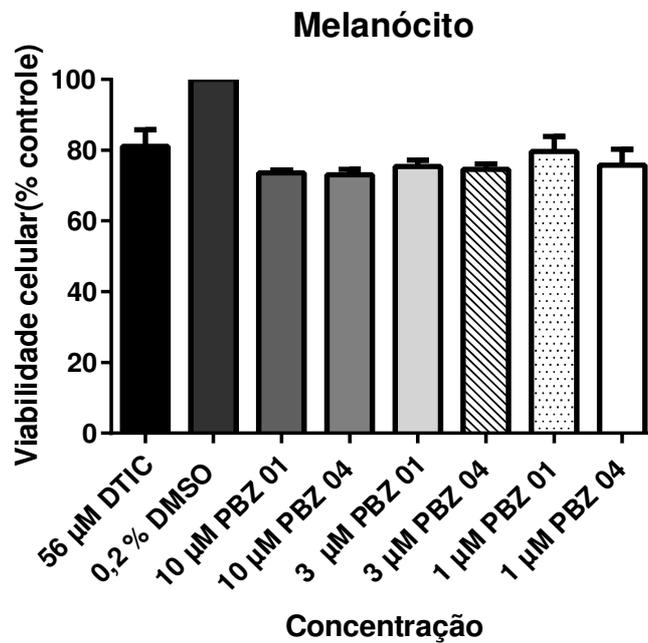


Figura 8

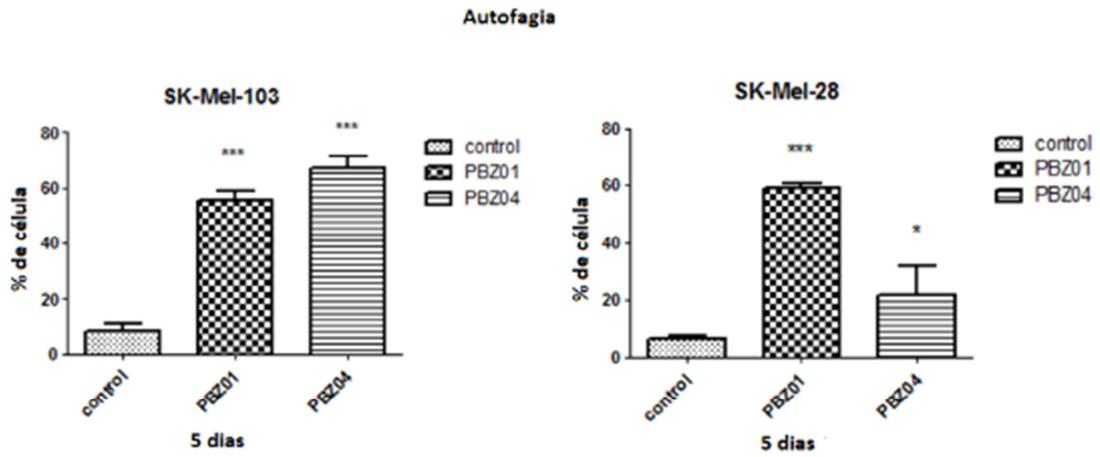


Figura 9

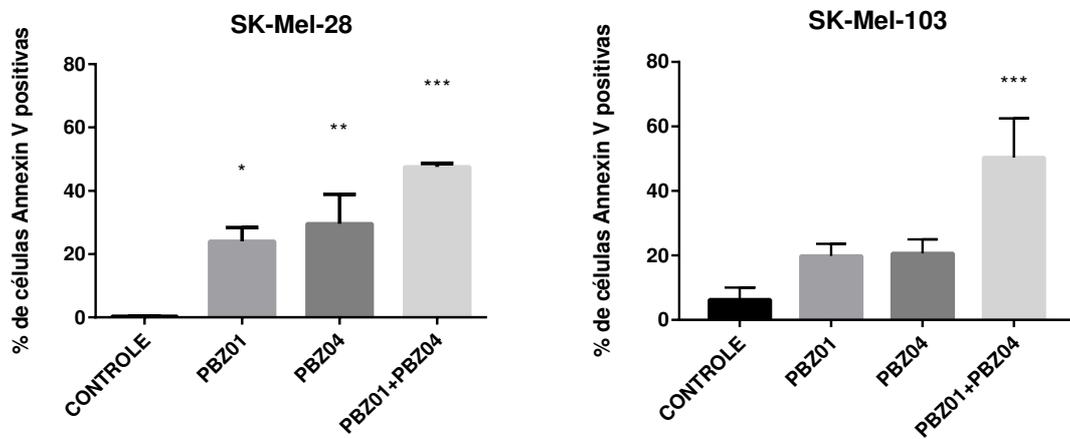
APOPTOSE

Figura 10

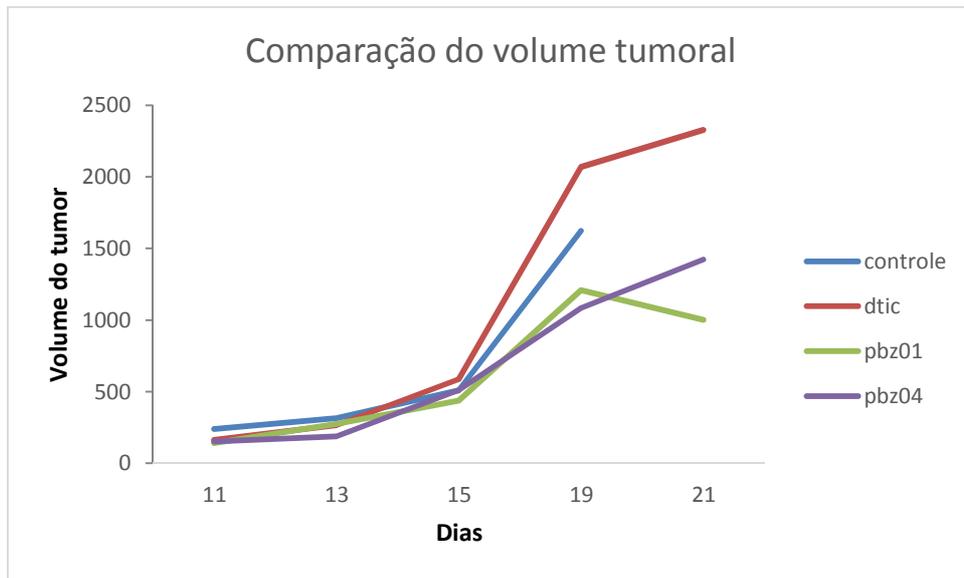


Figura 11

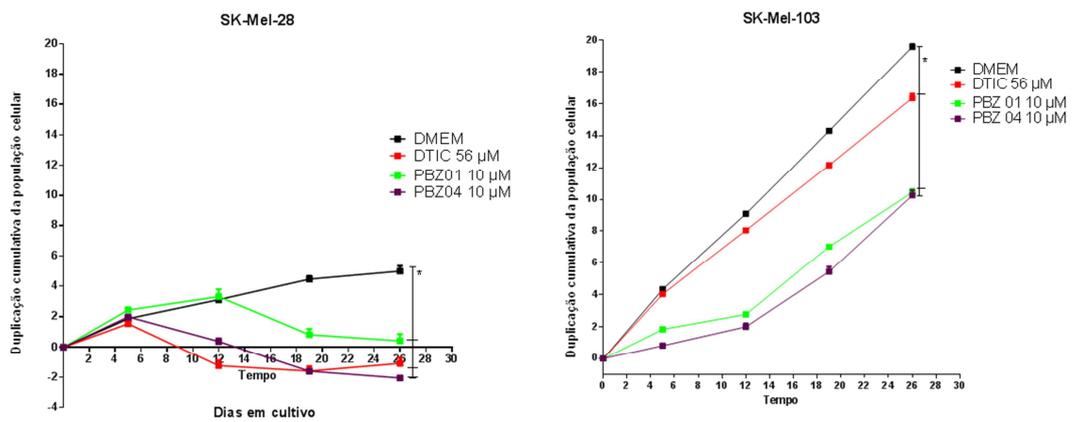


Figura 12

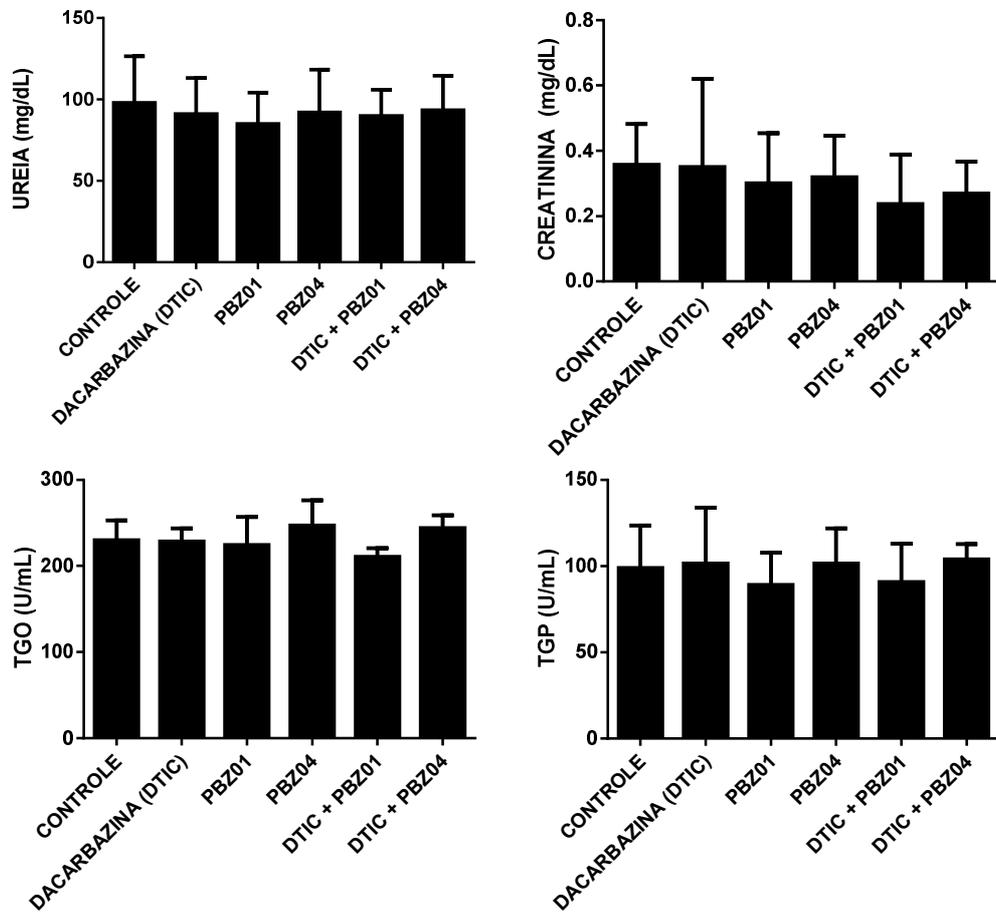


Figura 13

Resumo

USO DE COMPOSTO DERIVADO DE PIRIMIDOBENZIMIDAZOL

A presente invenção descreve o uso de compostos derivados de pirimidobenzimidazol para preparar de um medicamento para tratar câncer, e mais especificamente o uso do composto para preparar um medicamento para o tratamento de melanoma. Mais especificamente, o composto é selecionado do grupo consistindo de 4-fenil-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 4-(3-hidroxipropil)pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 2,3,4,3a,5,11a-hexaedro-4-oxo-furano[2',3';6,5]pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; pirimido[1,2-*a*]benzimidazol-2(1*H*)-ona; 4-metil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol; 2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol e 4-fenil-2-(trifluormetil)-pirimido[1,2-*a*]benzimidazol. A presente invenção se situa nos campos da química, farmácia e medicina.