



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

(21) BR 102012010889-5 A2

(22) Data do Depósito: 08/05/2012

(43) Data da Publicação: 04/10/2016



* B R 1 0 2 0 1 2 0 1 0 8 8 9 A

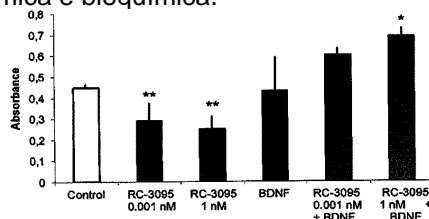
(54) Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTITUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E USO DE AGENTES MODULADORES DE BDNF/TRKB PARA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A AGENTES ANTITUMORAIS

(51) Int. Cl.: A61K 31/553; A61P 35/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS, HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

(72) Inventor(es): RAFAEL ROESLER, CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS, DANIELA BAUMANN CORNÉLIO, ANA LUCIA ABUJAMRA, GILBERTO SCHWARTSMANN

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTI-TUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E USO DE AGENTES MODULADORES DE BDNF/TrkB PARA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A AGENTES ANTITUMORAIS, A presente invenção descreve um novo e inventivo uso de agentes moduladores para a preparação de medicamentos para tratamento de tumores, composições compreendendo agentes moduladores anti-tumorais e método de modulação de tumores utilizando agentes moduladores. Mais especificamente descreve a modulação de BDNF/TrkB como modulador da resistência a agentes antitumorais. A presente invenção se situa no campo da medicina, química e bioquímica.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTI-TUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E USO DE AGENTES MODULADORES DE BDNF/TRKB
5 PARA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A AGENTES ANTITUMORAIS

Campo da Invenção

A presente invenção descreve um novo e inventivo uso de agentes moduladores para a preparação de medicamentos para tratamento de tumores, 10 composições compreendendo agentes moduladores anti-tumorais e método de modulação de tumores utilizando agentes moduladores. Mais especificamente descreve a modulação de BDNF/TkrB como modulador da resistência a agentes antitumorais. A presente invenção se situa no campo da medicina, química e bioquímica.

15

Antecedentes da Invenção

Apesar de avanços no tratamento do câncer de cólon e tumores femininos com a introdução de novas combinações de agentes quimioterápicos e de terapias “alvo” direcionadas biologicamente, novas alternativas de 20 tratamento são necessárias para aumentar a sobrevivência dos pacientes e reduzir a resistência ao tratamento. Os avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam o crescimento dos tumores podem contribuir para a identificação de novos agentes e formulações efetivas para o tratamento, bem como para o controle de sua proliferação em laboratório com 25 finalidade de pesquisa (Arnold e Seufferlein, 2010; Cunningham, 2010).

Receptores tirosina quinase (*receptor tyrosine kinases*, RTKs) são proteínas expressas na superfície celular que representam novos alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de terapias anti-câncer. Após serem ativados pela ligação de fatores de crescimento, os RTKs ativam vias de 30 sinalização intracelular que controlam a proliferação e a sobrevivência de

células tumorais (Krause e Van Etten, 2005). Os receptores tropomiosina quinase (*tropomyosin receptor kinases*, Trks) constituem uma família de RTKs ativados por proteínas conhecidas como neurotrofinas. TrkA, TrkB e TrkC são respectivamente os receptores para o fator de crescimento nervoso (*nerve growth factor*, NGF), o fator de crescimento derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) e a neurotrofina -3 (NT-3) (Barbacid, 1994). Vários estudos têm descrito a expressão de Trks em diferentes tipos de câncer (Desmet e Peeper, 2006; Nakagawara et al., 1993; 1994; Thiele et al., 2009). Além disso, a ativação de TrkB por BDNF aumenta a proliferação e sobrevivência celular em carcinoma celular transicional (TCC) (Huang et al., 2010b), enquanto um anticorpo direcionado contra o TrkB produziu toxicidade contra células de TCC (Huang et al., 2010a) e, ainda, mutações no TrkB foram detectadas em câncer de cólon (Bardelli et al., 2003; Desmet e Peeper, 2006).

Outros mecanismos que regulam de forma importante o crescimento tumoral, inclusive apresentando interações funcionais com BDNF/TrkB, são receptores acoplados a proteínas G (*G protein coupled receptors*, GPCRs) e vias de sinalização intracelular associadas (Dorsam e Gutkind, 2007; Hutchinson et al., 2009). Os GPCRs provavelmente envolvidos na progressão do câncer incluem o receptor do peptídeo liberador de gastrina (*gastrin-releasing peptide receptor*, GRPR), cujo principal ligante endógeno em mamíferos é o peptídeo liberador de gastrina (GRP), um peptídeo da família da bombesina (Cornelio et al., 2007; Patel et al., 2006).

Ainda são necessários novos medicamentos que contribuam no tratamento de pacientes com diversos tipos de câncer. Assim sendo, a presente invenção vem ampliar a gama de medicamentos contra o câncer, principalmente contra o câncer de cólon e tumores femininos, além oferecer uma alternativa a pacientes que apresentam resistência aos tratamentos já conhecidos.

Na presente invenção são apresentadas composições, usos e método de modulação de agentes tumorais através de moléculas moduladoras de BDNF/TrkB.

A busca na literatura científica e patentária apontou um documento relacionado a presente invenção, o qual será descrito a seguir.

O documento US 2001/0046959 descreve o uso de neurotrofinas e seus receptores no tratamento de câncer. Cita, mais particularmente, o uso de pequenas moléculas para a inibição de receptores Trk, inclusive o uso de K-252a e K-252b para a inibição de NGF e outras moléculas, sendo que K-252a é usada na inibição da autofosforilação de trkA, trkB e trkC. Uma modificação na molécula de k-252a, a CEP-751 mostra ações antitumorais em neuroblastoma e meduloblastoma, bem como em câncer de ovários e outros. As pequenas moléculas inibidoras de trk podem ser usadas no tratamento de câncer de próstata e pâncreas.

A presente invenção difere deste documento por apresentar a modulação de BDNF/TkrB na redução da resistência a outros agentes antitumorais.

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.

20

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma ampliação na gama de tratamentos contra o câncer, principalmente contra o câncer de cólon e tumores femininos, além oferecer uma alternativa a pacientes que apresentam resistência aos tratamentos já conhecidos. A presente invenção traz um novo e inventivo uso de agentes modulares para a preparação de medicamentos para tratamento de tumores, composições compreendendo agentes moduladores antitumorais e método de modulação de tumores utilizando agentes moduladores. Mais especificamente descreve o uso dos agentes moduladores de BDNF/TkrB na redução da resistência a agentes antitumorais.

30

É, portanto, um objeto da presente invenção o uso de agentes moduladores de BDNF/TrkB para preparação de medicamentos moduladores da resistência a agentes antitumorais.

Em uma realização preferencial, a modulação de BDNF e/ou a modulação da interação BDNF/TrkB compreende o uso de moduladores de GRPR e/ou EGFR e/ou TrkB.

É, portanto, um objeto adicional da presente invenção o uso de agentes moduladores de BDNF/TrkB para preparação de medicamentos para o aumento de resposta antitumoral e/ou modulação do sinergismo entre fármacos.

Em uma realização preferencial, o tumor a ser modulado é o câncer de cólon.

Em uma realização preferencial, a modulação do sinergismo ocorrerá em agentes antitumorais.

É, também, um objeto adicional da presente invenção uma composição moduladora de resistência a agentes antitumorais compreendendo:

- a) de 0,0001% a 99,9999% de agentes moduladores de BDNF/TrkB, seus derivados e/ou seus análogos;
- b) veículo farmacologicamente aceitável.

É, adicionalmente, um objeto da presente invenção um método de modulação de resistência a agentes antitumorais compreendendo a etapa de contatar células tumorais com resistência a agentes antitumorais com agentes moduladores de BDNF/TrkB.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1. BDNF impede a inibição da proliferação do câncer colorretal celular induzida pelo antagonismo de GRPR. a) BDNF bloqueou o efeito inibitório do antagonista do GRPR, RC-3095, sobre a proliferação celular.

Células HT-29 foram tratadas com o RC-3095, hrBDNF (10 ng / ml), e RC-3095 combinado com hrBDNF conforme descrito em Material e Métodos. A proliferação celular foi medida através do teste de MTT 48h após o tratamento. Os dados são demonstrados por média \pm SEM da absorbância (492 nm) de três experimentos diferentes, cada uma realizada em seis poços; * $p < 0,05$ e * $p < 0,01$ em relação ao controle das células. **b)** Inibição de Trk reduz a proliferação de células HT-29. O tratamento com diferentes doses do antagonista Trk K252a foi realizada conforme descrito em Material e Métodos. Os dados são demonstrados por média \pm SEM da absorbância (492 nm) de 5 experimentos diferentes, cada uma realizada em seis poços; * $p < 0,05$ em relação ao controle das células.

Figura 2. O bloqueio do GRPR aumenta a expressão e a secreção de BDNF em células humanas de câncer colorretal. **a)** O antagonista do GRPR, RC-3095, aumenta a expressão de RNAm de BDNF em células HT-29. As células foram tratadas com RC-3095, conforme descrito em Material e Métodos. Transcritos de β -actina- (180 pb, faixas superiores) e BDNF (362 pb, faixa inferiores) foram identificados. Os resultados representativos para as células controle e células tratadas com diferentes doses de RC-3095 são mostrados nas 4 diferentes barras. Os resultados no gráfico são mostrados como porcentagem da média \pm SEM dos níveis de RNAm de BDNF em quatro experimentos diferentes; * $p < 0,01$ em relação ao controle das células. **b)** RC-3095 produziu um aumento na secreção de BDNF em células HT-29. Níveis de BDNF foram avaliados por ELISA, conforme descrito no Material e Métodos. Os dados representam a média \pm SEM dos níveis de BDNF (pg / ml) em 5 experimentos diferentes, * $p < 0,05$ em relação ao controle de células. **c)** A única dose de RC-3095 (1 nM), que induziu um aumento significativo na secreção de BDNF foi também a única dose em que a sobrevivência das células não foi inibida por RC-3095. As células foram semeadas e tratadas com RC-3095, conforme descrito em Material e Métodos. Formação das colônias foi avaliada em microscópio, após 48 h de tratamento. Os resultados são apresentados

como percentual da fração de sobrevivência da média \pm SEM de 4 experimentos diferentes; * $p < 0,01$ em relação ao controle das células.

Figura 3. EGFR é necessário para o aumento da expressão de BDNF induzido pelo bloqueio do GRPR. **a)** Cetuximab (CTX) inibe a alteração na expressão de RNAm de BDNF induzida pelo antagonista de GRPR, RC-3095. Células HT-29 foram tratadas com CTX, RC-3095, ou CTX + RC-3095, e os níveis de RNAm de BDNF foram medidos por RT-PCR, conforme descrito em Material e Métodos. Transcritos de beta-actina- (180 pb, faixas superiores) e de BDNF (362 pb, faixas inferiores) foram identificadas. Os resultados representativos para as células controle e células tratadas com diferentes doses de RC-3095 são mostrados nas 5 barras diferentes. Os resultados no gráfico são mostrados como a média \pm SEM dos níveis de RNAm de BDNF em quatro experimentos diferentes; * $p < 0,01$ em relação ao controle das células. **b)** RC-3095 não altera a expressão de BDNF em uma linhagem de células-EGFR negativa de câncer colorretal. Células da linhagem SW620 foram tratados com diferentes doses de RC-3095. Os níveis de RNAm de BDNF foram medidos por RT-PCR, conforme descrito em Material e Métodos. Transcritos para beta-actina-(180 pb, faixas superiores) e BDNF (362 pb, faixas inferiores) foram identificadas. Os resultados representativos para as células controle e células tratadas com diferentes doses de RC-3095 são mostrados nas 4 barras diferentes. Os resultados no gráfico são demonstrados em porcentagem da média \pm SEM dos níveis de RNAm de BDNF em 4 experimentos diferentes. Não houve diferenças significativas entre os grupos. **c)** RC-3095 não afetou a secreção de BDNF nas células da linhagem SW620. Níveis de BDNF foram avaliados por ELISA, conforme descrito no Material e Métodos. Os dados são a média \pm SEM dos níveis de BDNF (pg / ml) de 6 experimentos diferentes. Não houve diferenças significativas entre os grupos. **d)** EGFR é expresso em células HT-29, mas não em SW-620. RNA foi extraído das células e a análise de RT-PCR foi realizada conforme descrito em Material e Métodos. Um transcrito de 190 pb representando um fragmento de EGFR foi detectado apenas em células HT-29. **e)** O antagonista de GRPR inibe a proliferação

celular em uma linhagem de células-EGFR negativo de câncer colorretal. A proliferação de células da linhagem celular SW620 foi medida através de MTT 48 h após o tratamento com o antagonista do GRPR, RC-3095, conforme descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm SEM da absorvância (492 nm) de três experimentos diferentes, cada uma realizada em seis poços; * $p < 0,05$ em relação ao controle de células.

Figura 4. Diagrama esquemático de um modelo para o papel, do BDNF e sua interação com GRPR em células de câncer de cólon. O antagonista GRPR, RC-3095, inibe a sinalização celular associada ao GRPR e produz um aumento na expressão e secreção de BDNF através de um mecanismo dependente de EGFR. O BDNF liberado pode ativar TrkB e bloquear parcialmente os efeitos inibitórios do bloqueio de GRPR sobre a sobrevivência e proliferação celular.

Figura 5. Expressão de mRNA para BDNF em células de câncer de mama, ovário e colo do útero. Foi verificada a expressão de BDNF nas linhagens celulares de câncer de mama, MCF-7, câncer de cólon uterino, HeLa e câncer de ovário, OVCAR-3 analisadas pela técnica de RT-PCR.

Figura 6. Efeito de BDNF em células de câncer de **a)** mama, **b)** ovário e **c)** colo do útero. A viabilidade celular das linhagens celulares de câncer de mama, MCF-7, câncer de cólon uterino, HeLa e câncer de ovário, OVCAR-3 foi verificada após o tratamento por 48 horas com hrBDNF nas doses de 1, 10 e 100 ng/mL através do método de MTT. A proliferação celular foi significativamente promovida pelo tratamento com BDNF nas células de câncer de ovário. O tratamento não teve efeito significativo nas células de mama e de colo do útero. A proliferação celular foi verificada 48 h depois do tratamento. Os dados são mostrados em porcentagem de viabilidade celular de 3 experimentos diferentes, cada um em sextuplicata; * $p < 0,05$ comparado com as células controle.

Figura 7. Efeito do bloqueio Trk sobre a viabilidade e proliferação em células de câncer de **a)** mama, **b)** ovário e **c)** colo do útero. A viabilidade celular das linhagens celulares de câncer de mama, MCF-7, câncer de cólon uterino,

HeLa e câncer de ovário, OVCAR-3 foi verificada após o tratamento por 48 horas com o inibidor de receptores Trks, K252a, nas doses de 10, 100 e 1000 nM através do método de MTT. O tratamento com K252a inibiu significativamente o crescimento celular dos três tipos de tumores femininos analisados. A proliferação celular foi verificada 48 h depois do tratamento. Os dados são mostrados em porcentagem de viabilidade celular de 3 experimentos diferentes, cada um em sextuplicata; ** $p < 0,01$ comparado com as células controle.

10 Descrição Detalhada da Invenção

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.

Agente Modulador

15 Na presente invenção o termo "agente modulador" é utilizado aqui para se referir a qualquer molécula química capaz de interagir com determinada molécula química de forma direta ou indireta como, por exemplo, mas não se limitando a, alterando a função de uma proteína pela ligação a essa proteína ou aumentando ou diminuindo a expressão protéica através dessa ligação.

20 Em uma realização preferencial, o agente modulador da presente invenção são moléculas capazes de interagir com BDNF/TrK de forma direta ou indireta como, por exemplo, mas não se limitando a, k252a e que promovem a redução da resistência de BDNF/TrK a agentes antitumorais.

Agente Bloqueador ou Antagonista

25 Na presente invenção o termo "agente bloqueador" ou "antagonista" é utilizado aqui para referir-se a um agente químico capaz de bloquear a ativação de uma proteína receptora localizada na superfície celular.

Tumor

30 Na presente invenção o termo "tumor" é utilizado aqui para referir-se a tecido com crescimento anormal e/ou sem função fisiológica no organismo

saudável, e que pode representar a existência de câncer ou estado pré-canceroso no organismo.

Célula Tumoral

Na presente invenção o termo “célula tumoral” é utilizado aqui para referir-se a células de câncer com taxa de proliferação alterada e/ou sem função fisiológica no tecido normal, as quais originam e formam um tumor.

Veículo Farmaceuticamente Aceitável

O veículo farmaceuticamente aceitável da presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmaceuticamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimentos de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

Exemplo 1. Realização Preferencial

Todos os protocolos experimentais foram aprovados por comitê de ética em pesquisa institucional (documentos de número CEP-HCPA 07-520 e 08-081).

As linhagens celulares humanas de câncer colorretal, HT-29 e SW620 foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, Maryland, EUA). As células cresceram e foram mantidas em frascos estéreis de 25cm² com meio de cultura completo RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) contendo 0,1% de fungizone (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 0,125% de gentamicina (Nova Farma, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Soral, Campo Grande, Brasil). As células foram conservadas em incubadora à temperatura de 37°C, com umidade relativa mínima de 95% com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, de poliestireno, com plano fundo na densidade de 7x 10³ células por poço.

O conteúdo de mRNA para BDNF em células de câncer de cólon humano das linhagens HT-29 e SW620 obtidas do *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, EUA) foi analisado por reação em cadeia de

polimerase com transcriptase reversa (*reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR*). O RNA total foi extraído das células usando reagente TRIzol reagent (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e transcrito com *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix®* (Invitrogen).

5 Os *primers* foram desenhados de acordo com as sequências correspondentes do *Gene Bank*. As condições de PCR semi-quantitativo foram otimizadas para determinar o número de ciclos que permitiriam a detecção dos produtos na fase linear da amplificação de transcritos de mRNA. Os experimentos foram realizados com 1,5 mM MgCl₂, 0,1 μM para cada *primer*, 0,2 mM DNTPs, 0,5 M betain, 1U Taq Platinum® (Invitrogen) e 2 μL de *template* de cDNA. A expressão de beta-actina foi medida como controle interno. As condições de PCR para β-actina e receptor do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor, EGFR*) foram 2,5 mM MgCl₂, 0,1 μM para cada *primer*, 0,2 mM DNTPs e 1U Taq Platinum (Invitrogen) e 1 μL cDNA.

15 Todos os ensaios foram realizados em um volume total de 20 μL usando 35 ciclos de amplificação, os quais consistiram em 1 minuto a 95° C, desnaturação a 94° C por 30 s, anelamento a 60° C por 30 s, extensão de *primers* a 72°C por 45 s, seguida por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de BDNF (362 bp), EGFR (190 bp) e beta-actina (190 bp) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% contendo GelRed™@ 10x (Biotium) e foram visualizados com luz ultravioleta (de Farias et al., 2008; de Oliveira et al., 2009; Flores et al., 2008). O comprimento dos fragmentos foi confirmado com Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen) e a expressão relativa do gene do BDNF foi determinada por densitometria utilizando ImageJ 1.37 para
25 Windows®. Cada experimento foi realizado em replicata com uso de RNA isolado de culturas celulares independentes e resultados representativos são mostrados. Para cada conjunto de reações de PCR, foi incluído um controle negativo. Os dados semi-quantitativos são mostrados como percentagem de alteração em relação ao controle, sendo que o valor mais baixo entre as
30 replicatas no grupo controle foi considerado 100%.

A expressão de TrkB em células HT-29 e SW620 foi analisada com imunohistoquímica de acordo com os métodos descritos em estudos anteriores (Cornelio et al., 2007; Flores et al., 2010). O anticorpo primário utilizado foi um anticorpo monoclonal de camundongo contra o domínio extracelular do TrkB humano (ab51190, Abcam plc., Cambridge, K), correspondente à porção
5 próxima ao sítio de fosforilação na tirosina 515. As amostras foram contracoradas com hematoxilina-eosina (HE) como controle.

Quarenta e oito horas após o tratamento, o sobrenadante foi removido e os níveis de BDNF foram medidos por ELISA (ChemiKine™, CYT306, Millipore, Billerica, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O meio celular de câncer colorretal ou amostras de tecido foram homogeneizados em solução salina com 1 mM de fluorido fenilmetilsulfonil e 1 mM de ácido etilenoglicotetracético. 100 uL de sobrenadantes foram adicionados nas placas de microtitulação por 24 h. A curva padrão de BDNF de 7,8 a 500 pg / ml foi preparada e as amostras foram diluídas 1:2 em *sample diluent* overnight a 4°C
10 após, as placas foram lavadas quatro vezes com *washing buffer* seguido pela adição do anticorpo monoclonal anti-BDNF diluído 1:1000 e incubado por 3 h em temperatura ambiente. Após a lavagem, os poços foram incubados com anticorpo conjugado anti-coelho peroxidase por 1 h em temperatura ambiente.
15 Após, houve a adição da enzima estreptavidina, substrato, e solução de parada, as concentrações de BDNF foram determinadas a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e a concentração de BDNF. BDNF foi express em pg de BDNF por ml de proteína. A proteína total foi medida pelo método de Bradford, usando albumina bovina sérica como padrão
20

As células foram cultivadas na densidade 1×10^4 células por poço em placas de 24 poços (TPP, Switzerland) em meio RPMI 1640 suplementado por 24h. O meio foi replaqueado e as células foram tratadas com RC-3095 (0.001, 1, or 1,000 nM; AEterna Zentaris GmbH, Frankfurt, Alemanha), BDNF recombinante humano ((hrBDNF; 0.01, 0.1, 1, or 10 ng/ml; Sigma-Aldrich, St
25 Louis, EUA), K252a (1, 10, 100, 1,000 nM Sigma-Aldrich, St Louis, EUA),

Cetuximabe (Erbix, C225, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), sozinhos ou combinados. As doses de RC-3095 ou dos demais agentes foram escolhidas com base em estudos prévios (de Oliveira et al., 2009; Flores et al., 2008). A viabilidade celular foi medida 48 horas após o tratamento por contagem celular com Tripan Blue (Vetec).

Para avaliação da proliferação e viabilidade celular em células de câncer de cólon, a técnica de contagem celular por exclusão por Azul de Tripan foi realizada de acordo com o método previamente descrito (de Oliveira et al., 2009; Flores et al., 2008). Brevemente, o meio foi removido e as células foram lavadas com HBSS (Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brazil), seguido pela adição de 100 μ L de tripsina/EDTA (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por poço para destacar as células. Em seguida, adicionou-se o mesmo volume de RPMI 1640 suplementado. Uma alíquota de 10 μ L de cada amostra foi homogeneizada a uma alíquota de 10 μ L de Azul de Tripan 0,5% e, o volume final foi colocado em um hemocítmetro permitindo a contagem celular no microscópio invertido. A razão entre as células coradas e não coradas, expressa a viabilidade celular (número de células viáveis). A proliferação e a viabilidade celular foram mensuradas através da contagem do número de células e a razão entre o número de células coradas e não coradas.

A proliferação celular em células de câncer de cólon também foi medida pelo método de MTT como previamente descrito (de Farias et al., 2008; Schmidt et al., 2010). Brevemente, as células foram lavadas com HBSS ((Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brazil), seguido pela adição de meio RPMI 1640 contendo 10% da solução de MTT (5mg/mL; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por poço. As células foram incubadas a 37°C por 4h. Após, a placa ficou em temperatura ambiente até que estivesse completamente seca. Após, 50 μ L de dimetil sulfóxido foi colocado em cada poço e a leitura da absorbância foi feita imediatamente no comprimento de onda de 492nm.

Células HT-29 foram semeadas em placas de 6 poços (400 células / poço) após o tratamento com RC-3095 por 48h. Após a incubação de 10-14

dias, as células foram fixadas com 70% etanol e contrastadas com cristal violeta a 0,5%. Somente colônias contendo 50 ou mais células foram contabilizadas no microscópio, como descrito anteriormente (de Oliveira et al., 2009). A fração de sobrevivência foi calculada como:

5

$$FS = \frac{\text{Número de colônias de células tratadas}}{\text{Número de colônias do controle}} \times 100$$

Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças entre os valores das médias foram avaliados por análise de variância de uma via seguida pelo teste de Tukey quando apropriado. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi indicado como estatisticamente significativo.

10

Para as avaliações em células de tumores femininos as linhagens celulares humanas MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer de colo de útero) e OVCAR-3 (câncer de ovário) foram obtidas do *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, EUA). As células foram cultivadas em placas de 96 wells em densidades de 4×10^3 , 7×10^3 e 3×10^3 células respectivamente por placa em sextuplicata, com meio de cultura Dulbecco Eagle modificado (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, EUA; MCF-7 e HeLa) e RPMI 1640 (Gibco BRL, Carlsbad, EUA; OVCAR-3), contendo 2% (w/v) H-glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; Soral, Campo Grande, Brazil).

15

Após 24 h, as culturas foram tratadas com BDNF recombinante humano (1, 10 ou 100 ng/mL; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), o antagonista Trk K252a (10, 100 ou 1.000 nM Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), o antagonista GRPR [D-Tpi⁶, Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesina (RC-3095, (0,001, 0,01, 0,1, 1 ou 10 μ M; Zentaris GmbH, Frankfurt, Alemanha), ou o antagonista GRPR Hca⁶, Leu¹³psi(CH₂N)Tac¹⁴-BN(6-14) (RC3940II, 0,01, 0,1, 0,5, 1 or 5 μ M; Zentaris GmbH, Frankfurt, Alemanha). Em outro experimento, as culturas foram submetidas por 24 h à deprivação com 0,5% de soro e então tratadas com GRP humano recombinante (0,001, 0,01, 0,1, 1 or 10 μ M; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). As doses dos agentes químicos foram escolhidas com base em estudos prévios (de Farias et al. 2008; Flores et al. 2008). As células foram

20

25

30

mantidas à temperatura de 37 °C, com umidade mínima relativa de 95% sob atmosfera com 5% de CO₂.

A viabilidade celular foi medida pelo método MTT 48 h após o tratamento. As células foram lavadas com solução balanceada salina de Hank (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 11 µl de solução de MTT a 5 mg/ml foram adicionados a cada *well* antes de incubação por 4 h a 37° C. A placa foi deixada à temperatura ambiente até estar completamente seca. Dimetil sulfóxido foi adicionado e a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor multiplacas (de Farias et al. 2008).

A análise da expressão de mRNA para BDNF e GRPR foi feita por RT-PCR. O RNA total foi extraído das células MCF-7, HeLa e OVCAR-3 usando reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e a transcrição reversa foi feita com SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix® (Invitrogen, EUA). Os *primers* para BDNF e GRP humanos foram desenhados de acordo com as sequências do Gene Bank: BDNF, *primers* 5'-GCGTGAATGGGCCCAAGGCAGG -3' e 5'-TGTGACCGTCCC GCCCGACATG -3'; GRPR, *primers* 5' - CAAGATCTTCTGCACGGTCA - 3' e 5' - TCAGTTTGCAGCCAATTCTG - 3'. Os experimentos com PCR foram realizados com 1,5 mM MgCl₂, 0.1 µM para cada *primer*, 0,2 mM dNTPs, 0,5 M betaína (somente para os *primers* de BDNF), 1U Taq Platinum® (Invitrogen) e 2 µl de *template* de cDNA. A expressão de beta-actina foi medida como um controle interno usando os *primers* 5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3' e 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 20µL usando a concentração de 0,04mM dNTPs, 0,2U Taq polimerase no tampão de reação apropriado, 0,3mM MgCl₂ e 10 pmol de cada *primer*. A amplificação consistiu de 1 minuto a 95°C seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 59°C por 30 s, extensão dos *primers* a 72°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de BDNF (362 bp), GRPR (190bp) e beta-actina (190bp) foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação

ultravioleta conforme descrito anteriormente (de Farias et al. 2008; Flores et al. 2008). Cada experimento foi realizado em triplicata usando RNA isolado a partir de culturas celulares independentes.

Para examinar o possível papel de BDNF/TrkB em câncer colorretal, nós tratamos células HT-29 com hrBDNF. Pelo fato de BDNF/TrkB poder interagir com a sinalização do neuropeptídeo GRPR em câncer, nós também investigamos o efeito de hrBDNF combinado com o antagonista de GRPR, RC-3095, uma droga experimental anti-tumoral que produz efeitos antiproliferativos em células HT-29 (Casanueva et al., 1996). Consistente com estudos prévios (Casanueva et al., 1996; Fernando et al., 2007), RC-3095 induz uma inibição significativa na proliferação celular avaliado pelos métodos de contagem celular e MTT. Cabe ressaltar que encontramos efeitos significativos de RC-3095 em células de câncer colorretal em doses menores que as descritas em estudos anteriores (Casanueva et al., 1996). O tratamento com hrBDNF sozinho em doses variando de 0,01 a 10 ng/ml não afetou significativamente a proliferação das células HT-29. No entanto, o co-tratamento com hrBDNF preveniu a diminuição da proliferação celular produzida por RC-3095 (**Figura 1A**). De fato, um aumento significativo na proliferação celular foi observada em células tratadas com hrBDNF combinado com 1 nM RC-3095. Por outro lado, o tratamento com o antagonista dos receptores Trk, K252a, resultou em uma diminuição dose-dependente na proliferação (**Figura 1B**). A expressão do mRNA para BDNF e GRPR e proteína para TrkB e GRPR em células HT-29 foi confirmada pelas técnicas RT-PCR e imunohistoquímica. Os resultados sugerem que o aumento da sinalização de BDNF/TrkB pode estar associado a uma resposta compensatória destinada a restabelecer os níveis normais de sobrevivência e proliferação de células submetidas a uma inibição pela sinalização de GRPR.

O tratamento com RC-3095 resultou em um aumento significativo nos níveis de RNAm de BDNF medido por RT-PCR semi-quantitativo (**Figura 2A**). RC-3095 na dose de 1 nM também produziu um aumento significativo nos níveis de BDNF avaliado pela técnica de ELISA sobre o sobrenadante obtido

da cultura celular, indicando um aumento na secreção de BDNF nas células HT-29 (**Figura 2B**). Vale ressaltar que a dose de RC-3095, que produziu um aumento significativo na secreção de BDNF não influenciou na sobrevivência celular da célula, avaliado pelo método clonogênico (**Figura 2C**). Além disso, 5 pode-se especular que o aumento da liberação de BDNF celular pode contribuir para o bloqueio induzido por BDNF nos efeitos do RC-3095 sobre a proliferação mostrado na **Figura 1**. Estes resultados são consistentes com a possibilidade de aumento da expressão e secreção de BDNF, e poderia representar uma resposta compensatória aos efeitos antiproliferativos da RC-10 3095.

Ainda, tivemos o objetivo de explorar possíveis mecanismos de sinalização envolvidos na mediação das alterações na expressão de BDNF induzidas pelo bloqueio de GRPR. Muitos dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) utilizam a ativação de EGFR como um intermediário de sinalização 15 em células de câncer (Liebmann et al., 2010). Além disso, é demonstrado que EGFRs regulam RNAm para BDNF e os níveis de proteína nos neurônios (Tirassa et al., 2003). Além disso, há *crosstalks* entre EGFR TrkB (Qiu et al., 2006). Nós quisemos analisar se EGFR estava envolvido com as alterações induzidas por RC-3095 sobre os níveis de BDNF. O co-tratamento com o 20 anticorpo monoclonal humano anti-EGFR, Cetuximabe, anulou completamente o aumento nos níveis de RNAm para BDNF induzidos por RC-3095 em células HT-29 (**Figura 3A**).

Além disso, RC-3095 não alterou a expressão de RNAm para BDNF 25 (**Figura 3B**) ou a secreção de BDNF (**Figura 3C**) na linhagem celular humana de câncer colorretal, SW620, que é EGFR-negativa (Balin-Gauthier et al., 2006). Análise por RT-PCR confirmou a expressão de RNAm para EGFR na linhagem celular HT-29, mas não em SW620 (**Figura 3D**). Tal como acontece com as células HT-29, a linhagem celular EGFR-negativa, SW620 expressa tanto RNAm quanto GRPR. EGFR não foi necessário para o efeito 30 antiproliferativo do RC-3095; o tratamento de células SW620 com o RC-3095 resultou em uma diminuição significativa na proliferação celular, avaliados por

MTT (**Figura 3E**) ou contagem celular. Não é possível fazer uma comparação direta entre os efeitos antiproliferativos causados por RC-3095 em células HT-29 e SW620, pois experimentos independentes foram realizados para cada linhagem celular. No entanto, vale ressaltar que, apesar de RC-3095 produzir uma resposta inibitória máxima de 44,44% em células HT-29 (**Figura 1A**), a mesma dose de RC-3095 produziu uma redução de 62,5% na proliferação de células de SW620 (**Figura 3E**). É possível que a maior sensibilidade das células da linhagem SW620 à RC-3095 esteja relacionada à ausência de um aumento significativo de BDNF induzido por RC-3095 nestas células, o que seria consistente com a possibilidade que o BDNF contribui para a resistência ao bloqueio de GRPR. Juntos, esses resultados indicam que EGFR é fundamental na mediação das alterações nos níveis de BDNF produzido pelo antagonismo do GRPR.

A **Figura 4** mostra um esquema apresentando um modelo para o papel da sinalização por BDNF/TrkB em câncer de cólon e sua interação com sinalização por GRPR e EGFR.

Em conjunto, esses dados indicam pela primeira vez que a sinalização por BDNF/TrkB pode estar envolvida na progressão de câncer de cólon, e que o bloqueio de BDNF/TrkB pode reduzir o crescimento de tumores de cólon.

Os resultados para células de câncer de ovário, mama e colo de útero são descritos a seguir. A expressão de mRNA para BDNF foi confirmada por RT-PCR nas linhagens celulares MCF-7, HeLa e OVCAR-3 (**Figura 5**).

A viabilidade/proliferação celular das linhagens celulares de câncer de mama, MCF-7, câncer de cólon uterino, HeLa e câncer de ovário, OVCAR-3 foi verificada após o tratamento por 48 horas com hrBDNF nas doses de 1, 10 e 100 ng/mL através do método de MTT. A proliferação celular foi significativamente promovida pelo tratamento com BDNF nas células de câncer de ovário, mas não teve efeito significativo nas células de mama e de colo do útero (**Figura 6**). Os resultados dos efeitos do antagonista Trk K252a, nas doses de 10, 100 e 1000 nM, são mostrados na **Figura 7**. O tratamento com

K252a inibiu significativamente o crescimento celular dos três tipos de tumores femininos analisados.

Em conjunto, esses resultados demonstram pela primeira vez que BDNF/TrkB podem estimular a viabilidade e o crescimento celular, enquanto o
5 uso de bloqueadores de BDNF/TrkB pode produzir efeitos antitumorais em células de câncer de mama, colo de útero e ovário.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTI-TUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E USO DE AGENTES MODULADORES DE BDNF/TRKB
5 PARA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A AGENTES ANTITUMORAIS

1. Uso de agentes moduladores de BDNF/TrkB caracterizado por ser para preparação de medicamentos moduladores da resistência a agentes antitumorais.
- 10 2. Uso de agentes moduladores de BDNF/TrkB caracterizado por ser para preparação de medicamentos para o aumento de resposta antitumoral e/ou modulação do sinergismo entre fármacos.
3. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pela modulação de BDNF e/ou a modulação da
15 interação BDNF/TrkB compreender o uso de moduladores de GRPR e/ou EGFR e/ou TrkB.
4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 ou 3, caracterizado pela modulação de BDNF e/ou a modulação da interação BDNF/TrkB compreender o uso do modulador k252-a.
- 20 5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo tumor a ser modulado ser o câncer de cólon.
6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pela modulação do sinergismo ocorrer em agentes antitumorais.
- 25 7. Composição moduladora de resistência a agentes antitumorais caracterizada por compreender:
 - a) de 0,0001% a 99,9999% de agentes moduladores de

FIGURAS

Figura 1:

Figure 1A

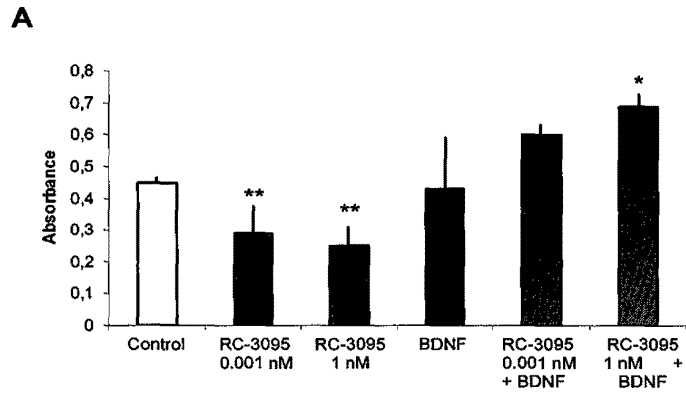


Figura 1:

Figure 1B

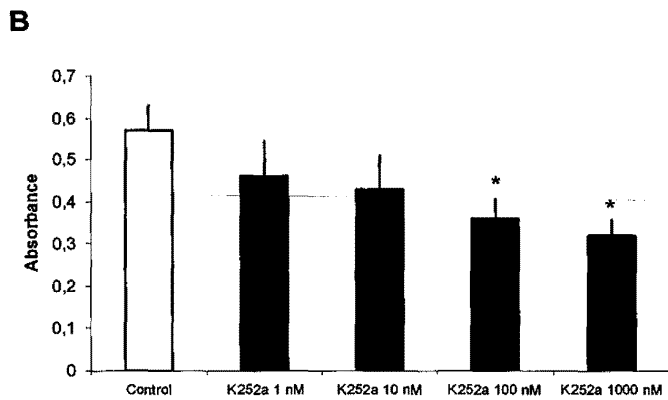


Figura 2:

Figure2C

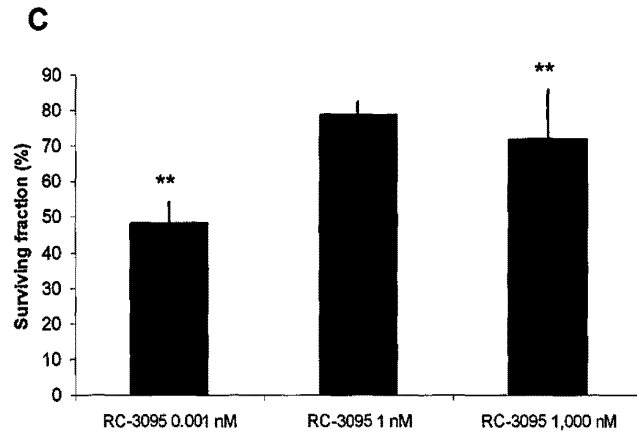


Figura 3:

Figure 3A

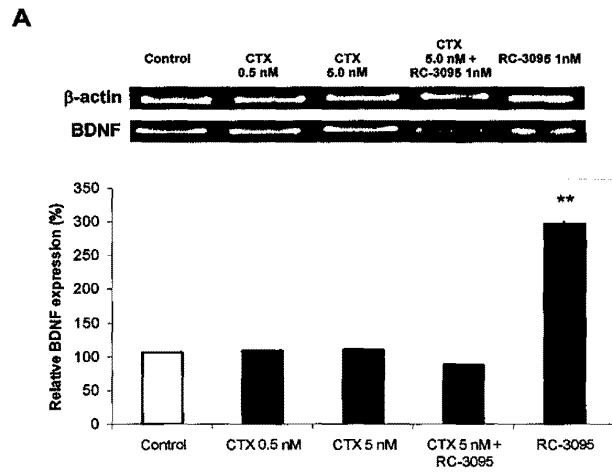


Figura 3:

Figure 3C, 3D

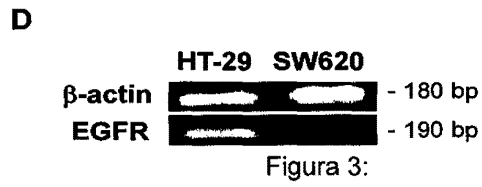
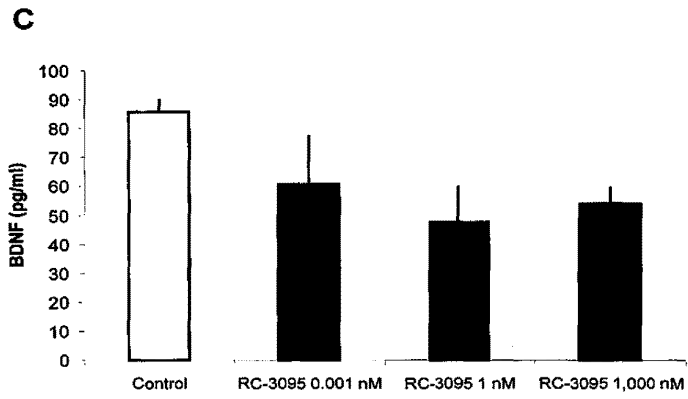


Figura 3:

Figure 3E

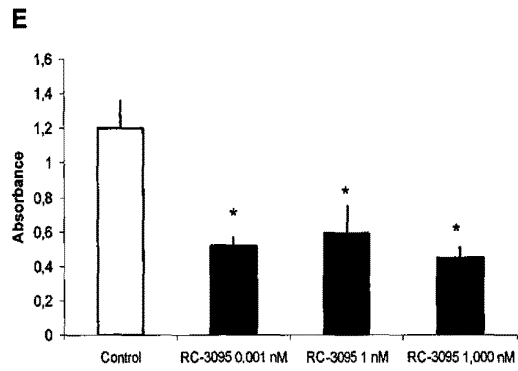


Figura 4:

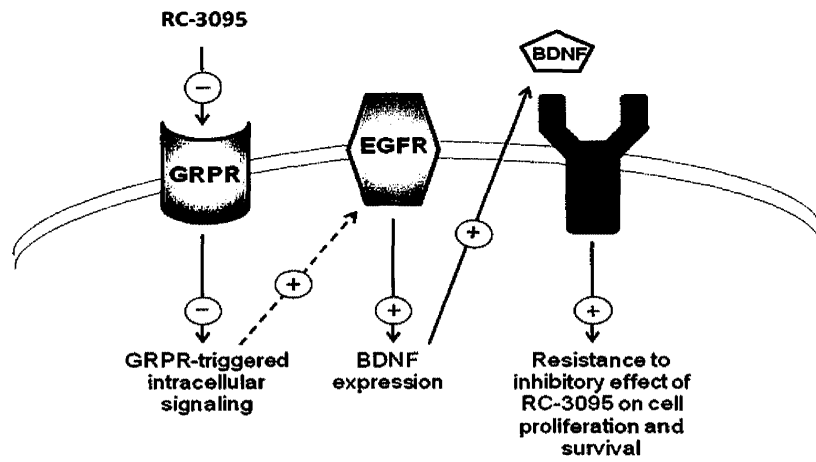


Figura 5:

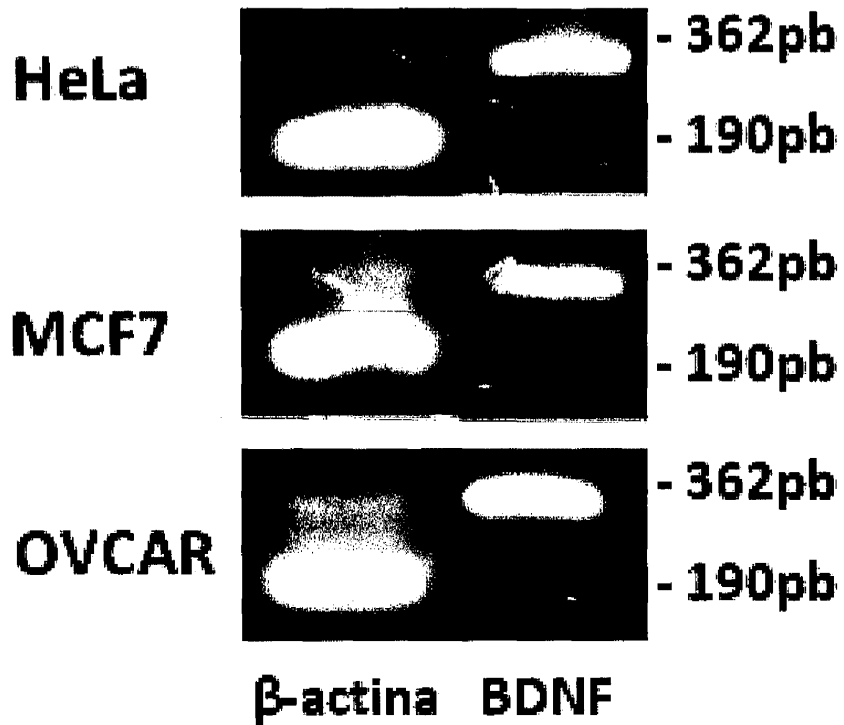


Figura 6A:

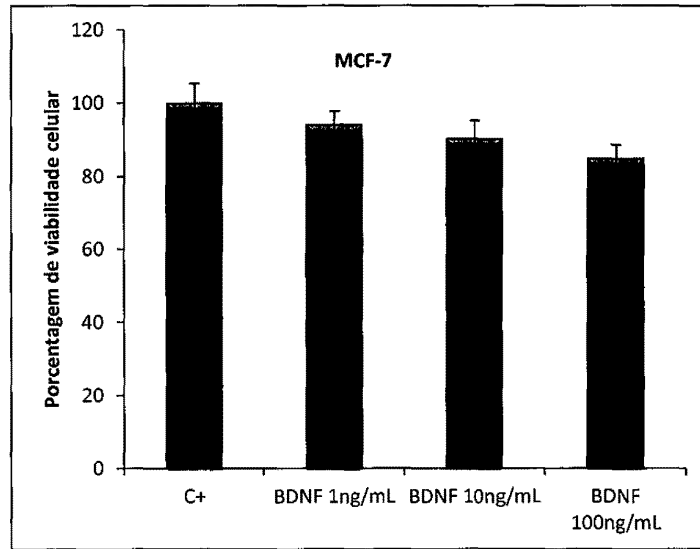


Figura 6B:

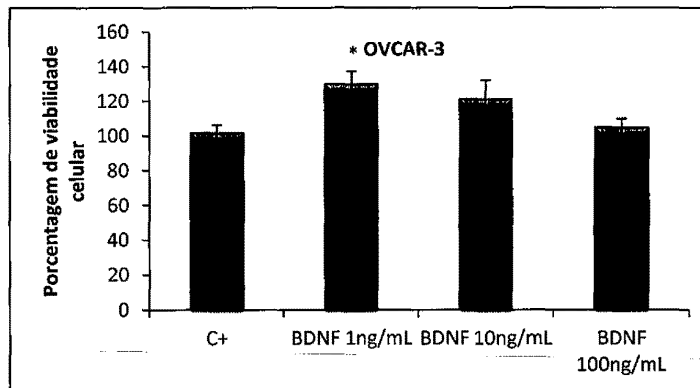


Figura 6C

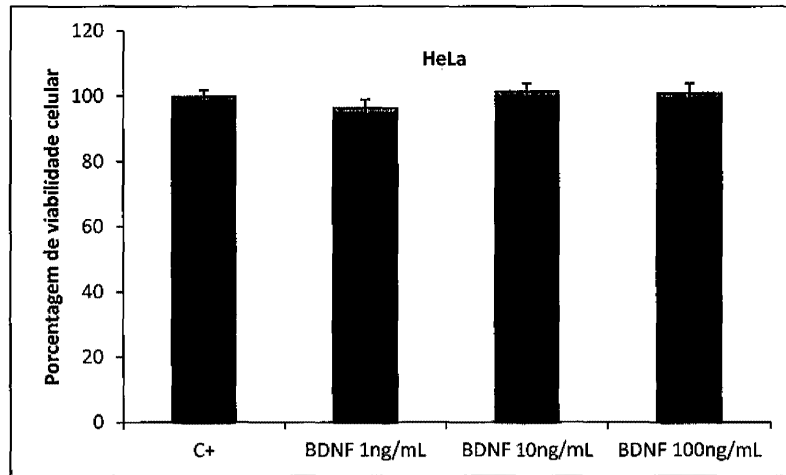


Figura 7A

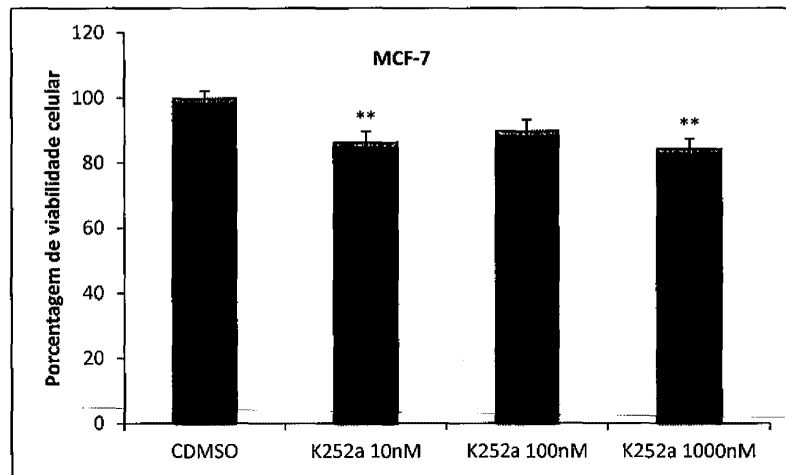


Figura 7B

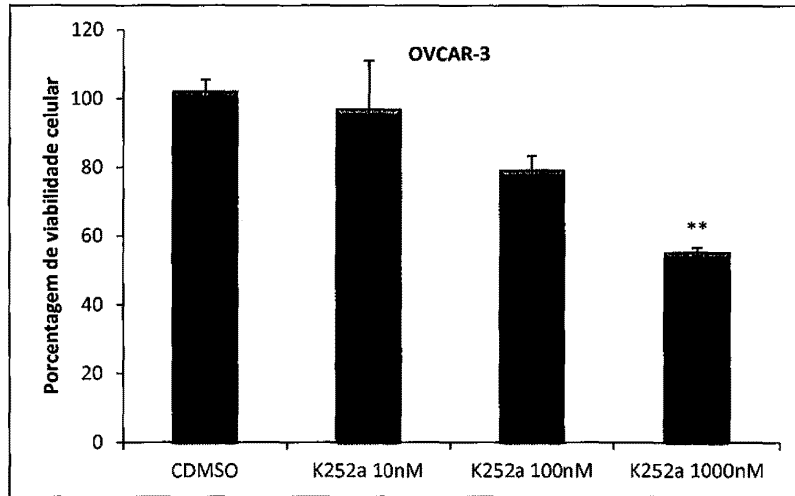
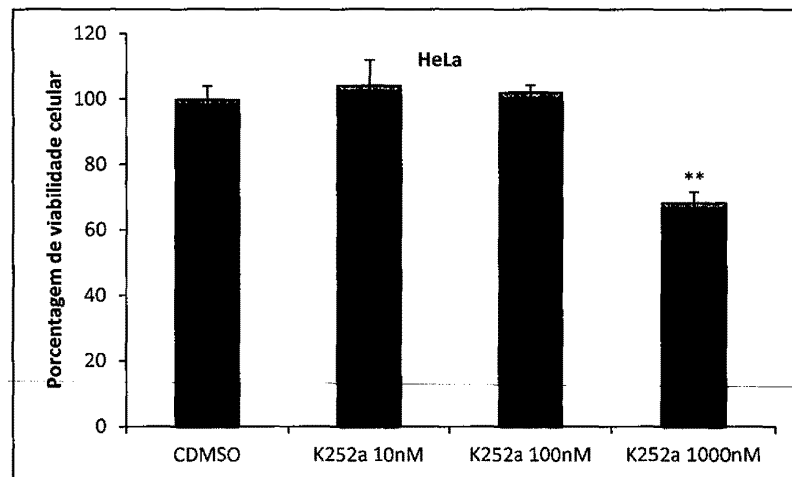


Figura 7C



Resumo

COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTI-TUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E USO DE AGENTES MODULADORES DE BDNF/TRKB PARA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A AGENTES ANTITUMORAIS

A presente invenção descreve um novo e inventivo uso de agentes moduladores para a preparação de medicamentos para tratamento de tumores, composições compreendendo agentes moduladores anti-tumorais e método de modulação de tumores utilizando agentes moduladores. Mais especificamente descreve a modulação de BDNF/TrkB como modulador da resistência a agentes antitumorais. A presente invenção se situa no campo da medicina, química e bioquímica.

15