



**IPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102012026574-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** BR 102012026574-5

**(22) Data do Depósito:** 17/10/2012

**(43) Data da Publicação Nacional:** 30/09/2014

**(51) Classificação Internacional:** C07D 311/22; A61K 31/353; A61K 31/397; A61K 31/40; A61P 35/00.

**(54) Título:** USO DO MBL-II-141 COMO UM INIBIDOR ESPECÍFICO DO TRANSPORTADOR ABCG2

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 695, Curitiba, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-310

**(72) Inventor:** GLAUCIO VALDAMERI; MARIA ELIANE MERLIN ROCHA; SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER; ATTILIO DI PIETRO; CHARLOTTE GAUTHIER; AHCÈNE BOUMENDJEL; ESTELLA GENOUX-BASTIDE.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 17/10/2012, observadas as condições legais

**Expedida em:** 20/07/2021

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



## USO DO MBL-II-141 COMO UM INIBIDOR ESPECÍFICO DO TRANSPORTADOR ABCG2

### Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito ao desenvolvimento de um novo inibidor específico do transportador ABCG2 também conhecido como BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) que poderia ser utilizado no tratamento de tumores cujas células superexpressam este transportador. Este transportador é capaz de conduzir à resistência de alguns tipos de cânceres ao tratamento com quimioterápicos por promoverem o efluxo do quimioterápico do interior destas células. A cromona MBL-II-141 (Figura 1) objeto deste estudo é capaz de inibir este transporte do quimioterápico para fora da célula e, assim, reverter esse fenótipo de resistência, melhorando a eficácia do tratamento.

### Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

Diferentes tipos de câncer apresentam resistência ao tratamento através do uso de quimioterápicos. O principal mecanismo envolvido nesse processo está relacionado ao aumento na expressão de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), presentes na membrana plasmática destas células tumorais. Estes transportadores ABC são capazes de transportar os quimioterápicos para fora das células tumorais, diminuindo a concentração intracelular da droga e conseqüentemente acarretando na falha do tratamento.

Dentre os principais transportadores da família ABC, envolvidos com a resistência ao tratamento com quimioterápicos e que apresentam comprovada relevância clínica, encontramos a glicoproteína-P (P-gp), MRP1 (*Multidrug-Resistance Associated Protein-1*) e ABCG2, também conhecido como BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), sendo este último o transportador ABC alvo deste invento.

Devido à descoberta de ABCG2 ser relativamente recente (1998), quando comparado a glicoproteína-P (1976), ainda existe poucos inibidores do transportador ABCG2 disponíveis, sendo que nenhum dos inibidores específicos de ABCG2 descritos na literatura científica até o momento apresenta potencial para uso clínico, fato atribuído a alta toxicidade destes compostos. Esta realidade encontrada para inibidores de ABCG2 é diferente da glicoproteína-P, onde inibidores já estão sendo utilizados em testes clínicos desde 2001. Porém, devido ao fato de que as células tumorais apresentam um elevado nível de expressão não apenas de um único transportador, mas sim de vários, os resultados clínicos utilizando apenas inibidores da glicoproteína-P estão abaixo das expectativas, surgindo a necessidade de inibidores dos outros transportadores ABC para uso em conjunto, como é o caso do transportador ABCG2, para assim contornar a resistência ao tratamento do câncer através do uso de quimioterápicos.

O transportador ABC pertencente a subfamília G, ABCG2, foi o transportador envolvido na resistência a quimioterapia descoberto mais recentemente. Três laboratórios independentes foram responsáveis por identificá-lo e o nomearam de acordo com o modelo utilizado. Doyle e colaboradores em 1998 identificaram que células de câncer de mama MCF-7/AdrVp que não expressavam P-gp e MRP1, apresentavam resistência a quimioterapia, nomeando a nova proteína responsável como BCRP, devido ao fato de promover resistência em células de câncer de mama (*Breast Cancer Resistance Protein*) (Doyle, L. A. et al., **A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15665-15670, 1998).

Dois outros grupos identificaram duas proteínas com seqüência quase idêntica ao mesmo tempo, e a chamaram de MXR, pois foi

identificada em uma linhagem de células de carcinoma de cólon humano (S1-M1-80), que era resistente a mitoxantrona (MXR) (Miyake, K. et al., **Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes.** Cancer Research, 59, 8-13, 1999) e ABCP, devido a sua presença na placenta (Allikmets, R. et al., **A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.** Cancer Research, 58, 5337-5339, 1998).

ABCG2 é uma glicoproteína de 655 aminoácidos conferindo a esta molécula uma massa de 72 KDa (Sarkadi, B. et al., **ABCG2 - a transporter for all seasons.** Febs Letters, 567, 116-120, 2004). ABCG2 é um meio-transportador, ou seja, precisa se dimerizar para formar a estrutura ativa. ABCG2 também apresenta funções fisiológicas importantes e é capaz de transportar uma grande quantidade de substratos (mitoxantrona, topotecan, SN-38 entre outros) (Boumendjel, A. et al., **Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation.** Current Medicinal Chemistry, 18, 3387-3401, 2011). Usando o anticorpo monoclonal BXP-21, foi demonstrado que ABCG2 está presente em diversos tipos de tumores sólidos, com particular abundância em tumores do trato digestivo, endométrio e melanoma (Diestra, J. E. et al., **Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material.** Journal of Pathology, 198, 213-219, 2002), entretanto, seu papel na resistência a quimioterapia é melhor evidenciado em leucemias (Galimberti, S. et al., **Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients.** Leukemia Research, 28, 367-372, 2004). ABCG2 também é expresso em células tronco hematopoiéticas onde serve como um

marcador de uma população de células chamada side-population (SP), que serve para distinguir uma sub-população de células marcadas (Scharenberg, C. W. et al., **The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors.** Blood, 99, 507-512, 2002).

5      Uso de inibidores dos transportadores ABC

O método mais simples e direto para reverter à resistência causada pelos transportadores ABC, é bloquear o transporte de substratos através do uso de inibidores. Muitos laboratórios estão  
10      trabalhando na busca de novos inibidores, sendo que algumas características são cruciais para o desenvolvimento de novos inibidores, como: (i) alta afinidade pelo transportador, resultando em eficácia a baixas concentrações, (ii) ser específico para apenas um transportador, (iii) não ter interação farmacocinética com os quimioterápicos, (iv) não  
15      ser transportado e (v) baixa toxicidade (Boumendjel, A. et al., **Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation.** Current Medicinal Chemistry, 18, 3387-3401, 2011).

Uso de inibidores do transportador ABCG2

20      Os inibidores de ABCG2 podem ser divididos em dois tipos: inibidores específicos, como a fumitremorgin C (FTC) ou inibidores não específicos, como o GF120918, que inibe tanto ABCG2 quanto P-gp (Nicolle, E. et al., **Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): New inhibitors and QSAR studies by a 3D linear solvation energy approach.**  
25      European Journal of Pharmaceutical Sciences, 38, 39-46, 2009). O primeiro inibidor específico de ABCG2 identificado foi o FTC (fumitremorgin C), isolado de *Aspergillus fumigatus* Fresenius, sendo capaz de inibir o transporte de mitoxantrona, doxorubicina e topotecan em células S1-M1-3.2 e MCF7/ABCG2 (Rabindran, S. K. et al., **Reversal of**

**a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C.** *Cancer Research*, 58, 5850-5858, 1998; Rabindran, S. K. et al., **Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein.** *Cancer Research*, 60, 47-50, 2000). Entretanto, o FTC mostrou-se neurotóxico, promovendo tremores e convulsões em camundongos, o que impossibilitou a continuação dos testes em ensaios clínicos (Boumendjel, A. et al., **Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation.** *Current Medicinal Chemistry*, 18, 3387-3401, 2011).

Novos inibidores de ABCG2 surgiram, como é o caso do Ko143, um análogo do FTC, com a vantagem de não apresentar toxicidade, porém, não são completamente seletivos para ABCG2, mas possuem uma alta afinidade pelo transportador quando comparado a P-gp e MRP1. Outras classes de inibidores de ABCG2 também já foram descritas, como os taxóides, derivados do elacridar (GF120918), derivados do tariquidar, rotenóides, xantonas, chalconas, entre várias outras (Boumendjel, A. et al., **Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation.** *Current Medicinal Chemistry*, 18, 3387-3401, 2011). Uma classe de inibidores de ABCG2 que recentemente tem ganhado atenção é representada pelos inibidores de tirosina quinases, porém estes compostos não são específicos e interagem também com P-gp e MRP1 (Hegedus, T. et al., **Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1587, 318-325, 2002; Shukla, S. et al., **Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters - present status and challenges.** *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4, 205-223, 2008). Vários destes inibidores são também

substratos dos transportadores ABC, ou seja, são transportados e provavelmente bloqueiam o transporte de outros substratos por competição entre eles.

5 Para ABCG2 ainda não existem excelentes inibidores com potencial de uso clínico como no caso da P-gp, havendo a necessidade de identificar inibidores que não apresentem citotoxicidade, não sejam transportados, apresentem uma alta afinidade e ainda sejam seletivos para esse transportador. Além disso, ainda não há dados clínicos do uso de inibidores de ABCG2.

10 Esta invenção está baseada na ação do MBL-II-141 (5-(4-bromobenziloxi)-2-(2-(5-metoxindolil)etil-1-carbonil)-4H-cromen-4-ona (figura 1), como um inibidor do transportador ABCG2. Foi demonstrado que o MBL-II-141 é capaz de inibir especificamente o transportador ABCG2 com uma alta afinidade. Também foi demonstrado que o MBL-II-141 apresenta uma baixa citotoxicidade. Além disso, quando células que superexpressam ABCG2 (HEK293ABCG2) foram tratadas com os quimioterápicos (mitoxantrona e SN-38) juntamente com o MBL-II-141 (0,2 e 1  $\mu$ M) verificou-se a reversão da resistência aos quimioterápicos (mitoxantrona e SN-38). O co-tratamento de mitoxantrona com o MBL-II-141 foi capaz de reverter completamente este fenótipo de resistência. O mesmo resultado foi observado quando o quimioterápico mitoxantrona foi substituído por SN-38. Os resultados confirmam que o MBL-II-141 é capaz de reverter a resistência ao tratamento quimioterápico em células que superexpressam o transportador ABCG2.

#### 25 Descrição da abordagem do problema técnico

O objetivo deste invento é de conseguir reduzir ou reverter à resistência a quimioterapia envolvida com a superexpressão do transportador ABCG2 em células tumorais, através da utilização do composto MBL-II-141, que foi descrito como chromone **6g** em nossa

recente publicação no Journal of Medicinal Chemistry (Valdameri, Glaucio; Genoux-Bastide, Estelle; Peres, Basile; Gauthier, Charlotte; Guitton, Jérôme; Terreux, Raphaël; Winnischofer, Sheila M. B.; Rocha, Maria E.M.; Boumendjel, Ahcène; Di Pietro, Attilio. **Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein.** Journal of Medicinal Chemistry, 55, 966-970, 2012), na qual foram apresentados os resultados obtidos que comprovam a sua propriedade inibidora do transporte de quimioterápicos pelo transportador ABCG2. Este composto, um candidato a medicamento, poderia ser utilizado separadamente ou em conjunto com outros inibidores de outros transportadores ABC.

#### Citação das Figuras

A figura 1 ilustra a estrutura química do MBL-II-141

A tabela 1 ilustra a inibição do transporte de substratos pelo MBL-II-141 em células superexpressando ABCG2, P-gp e MRP1. Para as células superexpressando ABCG2 (HEK293ABCG2), o substrato utilizado foi a mitoxantrona (5  $\mu$ M) e a porcentagem de inibição foi determinada em relação ao inibidor controle GF120918 (5  $\mu$ M), o qual inibe 100% do transporte. Os valores de porcentagem de inibição e IC<sub>50</sub> (o IC<sub>50</sub> corresponde à concentração do composto necessária por inibir metade do transporte do quimioterápico em células que superexpressam o transportador ABCG2) foram determinados por citometria de fluxo e os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Para as células que superexpressam P-gp (HEK293ABCB1), as condições foram as mesmas que para células HEK293ABCG2. Para as células que superexpressam MRP1 (HEK293ABCC1), o substrato utilizado foi a calceína (0,2  $\mu$ M) e a porcentagem de inibição foi determinada em relação as células

transfectadas com o vetor vazio. Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

A figura 2 ilustra a citotoxicidade do MBL-II-141. A viabilidade celular foi realizada pelo método do MTT em células superexpressando ABCG2 - HEK293ABCG2 e células controle HEK293 transfectadas com o vetor vazio após 72 horas de tratamento com o MBL-II-141. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem de células viáveis em relação ao controle sem tratamento. Os dados são referentes a pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata.

10 A figura 3 ilustra a sensibilização de células superexpressando ABCG2 pelo MBL-II-141. Reversão da resistência aos quimioterápicos (mitoxantrona e SN-38) em células superexpressando ABCG2. A viabilidade celular em células HEK293 transfectadas como o vetor vazio e em células superexpressando ABCG2 (HEK293ABCG2) na presença dos quimioterápicos mitoxantrona e SN-38 foi realizada após 72 horas de tratamento pelo método do MTT. Nas mesmas condições as células HEK293ABCG2 foram co-tratadas com o MBL-II-141. Os valores representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Os resultados representam a porcentagem das células viáveis em relação ao controle sem tratamento.

20 A figura 4 mostra as condições que foram utilizadas na síntese do composto **5** que é um dos compostos chave para a síntese das cromonas que foram testadas, incluindo a cromona **6g** (o MBL-II-141). Na figura 4 as condições utilizadas para a síntese foram designadas por letras minúsculas que representam: (a)  $R_1$ -NH- $R_2$ , BOP-Cl, DMF; (b) Ar-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Br, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona; (c) (i) Dietiloxalato, EtO-Na<sup>+</sup>/EtOH; (ii) KOH, EtOH/H<sub>2</sub>O. Para R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> ver Tabela 1.

Descrição detalhada da Invenção

A idéia de sintetizar cromonas para testar sua capacidade inibitória sobre transportadores ABC iniciou-se quando se verificou que um dos inibidores de referência de ABCG2, o GF120918, também inibia o transporte de substratos pela P-gp (Boumendjel, A. et al., **Targeting the**

5 **Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation.** *Current Medicinal Chemistry*, 18, 3387-3401, 2011). Usando como base estrutural o GF120918, o grupo do Dr. Attilio Di Pietro identificou uma série de novos inibidores seletivos de

10 **ABCG2 (Boumendjel, A. et al., **Acridone derivatives: Design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2892-2897, 2007).** O melhor inibidor de ABCG2 desta série de compostos baseados no núcleo básico das acridonas foi o MBLI-87, que foi identificado *in vitro* e posteriormente testado *in vivo*, e que apesar de sua toxicidade apresentou efeitos promissores (Arnaud,

15 O. et al., **The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to Irinotecan.** *European Journal of Cancer*, 47, 640-648, 2011).

Para continuar a busca de novos inibidores de ABCG2 com maior afinidade e menor toxicidade, o anel base das acridonas do GF120918

20 foi substituído pelo anel base das cromonas, sendo que a escolha dos substituintes dispostos nesse anel teve como objetivo aumentar o potencial de inibição de ABCG2 e também diminuir a citotoxicidade destes compostos. O processo de síntese das cromonas analisadas, incluindo a cromona **6g** (MBL-II-141), foi descrito e publicado na revista

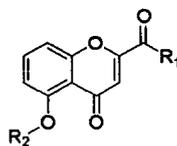
25 *Journal of Medicinal Chemistry* no mesmo artigo onde foram publicados os resultados de inibição do transportador ABCG2 e as análises de citotoxicidade do composto (Valdameri, G. et al., **Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast**

**Cancer Resistance Protein.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 966-970, 2012).

A síntese da cromonas inicia-se pelo acesso aos compostos chave da síntese dos cromona -2- ácidos carboxílicos **1** e **5** (Figura 4 e Tabela 1). A síntese do **1** foi realizada de acordo com o reportado anteriormente (Boumendjel, A. et al., **Piperazinobenzopyranones and phenalkylaminobenzopyranones: potent inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2).** *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 7275-7281, 2005; Hadjeri, M. et al., **Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 2125-2131, 2003. A síntese do **5** foi obtida como mostrado na figura 4. 2,6 Dihidroxiacetofenona reage com um adequado aril alquil haleto (1 equiv) na presença do  $K_2CO_3$  em acetona para obter o derivado mono O-alkilado **4**. O composto foi condensado com etiloxalato usando etóxido de sódio como uma base para render um ester desejado, o qual foi então hidrolizado pra dar o ácido carboxílico **5** correspondente. Finalmente, este ácido foi condensado com aril alquil amins ou N-arilpiperazinas para dar os compostos finais **6**.

Esta invenção está baseada na ação do MBL-II-141 (5-(4-bromobenziloxi)-2-(2-(5-metoxindolil)etil-1-carbonil)-4H-cromen-4-ona (figura 1) ou cromona **6g**, como um inibidor do transportador ABCG2. Foi demonstrado que o MBL-II-141 é capaz de inibir especificamente o transportador ABCG2 com uma alta afinidade. Para demonstrar este efeito, as células da linhagem de fibroblastos HEK293, transfectadas de maneira estável com o vetor vazio (células controle que não superexpressam ABCG2) e células HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar o transportador ABCG2, foram em placas de 24 poços. Após 48 horas de adesão, as células foram tratadas com 5  $\mu$ M de mitoxantrona por 30 minutos a 37°C na ausência ou presença do

TABELA 1 – CROMONAS SINTETIZADAS



| Cromonas  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> |
|-----------|----------------|----------------|
| <b>1</b>  | H              | H              |
| <b>2a</b> |                | H              |
| <b>2b</b> |                | H              |
| <b>5a</b> | OH             |                |
| <b>6a</b> |                |                |
| <b>6b</b> |                |                |
| <b>6c</b> |                |                |
| <b>6d</b> |                |                |
| <b>6e</b> |                |                |
| <b>6f</b> |                |                |
| <b>6g</b> |                |                |
| <b>6h</b> |                |                |
| <b>6i</b> |                |                |

MBL-II-141 (nas doses de 1 e 5  $\mu\text{M}$ ). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, coletadas, ressuspensas em 0,2 mL de PBS e mantidas em gelo até análise por citometria de fluxo. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra, sendo que o controle de 100% de inibição foi obtido pela fluorescência (GMean), das células controle (transfectadas com o vetor vazio), ou usando células HEK293ABCG2 incubadas com 5  $\mu\text{M}$  de GF120918 (inibidor de referência). Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados utilizando o programa GraphPadPrism.

Como apresentado na tabela 2, foi observado que o MBL-II-141 foi capaz de inibir o transporte de mitoxantrona através do transportador ABCG2 e apresentou um  $\text{IC}_{50}$  de 0,11  $\mu\text{M}$ . A seletividade do MBL-II-141 em inibir o transportador ABCG2 foi testada frente aos dois outros transportadores ABC envolvidos na resistência a quimioterapia, P-gp e MRP1. Os substratos utilizados neste ensaio foram a mitoxantrona e calceína, para P-gp e MRP1, respectivamente. Os modelos celulares utilizados foram células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar P-gp (células HEK293ABCB1) e MRP1 (células HEK293ABCC1). Os resultados visualizados na tabela 2 mostram que o MBL-II-141 foi específico para inibir o transporte de substratos por ABCG2, uma vez que não inibiu o transporte de mitoxantrona pela P-gp e de calceína por MRP1.

Também foi demonstrado que o MBL-II-141 apresenta uma baixa citotoxicidade (figura 2). O teste utilizado para quantificar a citotoxicidade celular foi o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}, teste rotineiramente utilizado para este fim e que é baseado na atividade de desidrogenases mitocondriais, que reduzem o MTT em formazan. O ensaio foi realizado em células superexpressando ABCG2 (HEK293ABCG2) e células HEK293 transfectadas com o vetor vazio ( $1 \times 10^4$ ), que foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24h

de adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações do MBL-II-141 (1-100  $\mu\text{M}$ ), por 72 horas. Os controles (100% de células viáveis) foram realizados com meio de cultura contendo 0,1% de DMSO (v/v). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento). Como se pode observar na figura 2, o MBL-II-141 apresentou baixa citotoxicidade, reduzindo em menos de 30% a viabilidade de ambas as linhagens celulares na maior concentração testada (100  $\mu\text{M}$ ) (figura 2).

Tabela 2: inibição do transporte de substratos pelo MBL-II-141 em células superexpressando ABCG2, P-gp e MRP1

|            | ABCG2<br>HEK293ABCG2 |                  |                                    | P-gp<br>HEK293ABCB1 | MRP1<br>HEK293ABCC1 |
|------------|----------------------|------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|
|            | Inibição (%)         |                  | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) | Inibição(%)         |                     |
|            | 1 $\mu\text{M}$      | 5 $\mu\text{M}$  |                                    | 5 $\mu\text{M}$     |                     |
| MBL-II-141 | 114,9 $\pm$ 24,7     | 115,8 $\pm$ 13,7 | 0,11                               | -16,06 $\pm$ 1,28   | 2,86 $\pm$ 1,83     |

Este conjunto de dados científicos, quando comparado a outros inibidores já identificados em ensaios similares, como é o caso da 6-prenilcrisina (Ahmed-Belkacem, A., et al. **Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2.** Cancer Research, 65, 4852-4860, 2005), MBLI-87 (Arnaud, O., et al. **The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan.** European Journal of Cancer, 47, 640-648, 2011), estilbenos (Valdameri, G., et al. **Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance**

**protein.** ACS chemical biology, 7, 322-330, 2012) e o Ko143 (Allen, J. D., et al., **Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C.** Molecular Cancer Therapeutics, 1, 417-425, 2002), fazem do MBL-II-141 um candidato para uso clínico como inibidor do transporte de quimioterápicos por ABCG2.

Exemplo 1: Reversão da resistência ao tratamento com os quimioterápicos mitoxantrona ou SN-38 em células superexpressando ABCG2

10 Para ampliar os resultados obtidos com o MBL-II-141, como inibidor do transportador ABCG2, foi verificado se este composto era capaz de reverter à resistência ao tratamento com quimioterápicos após longos períodos de tratamento (72 horas), uma vez que o ensaio de inibição foi realizado em 30 minutos. Para os ensaios de reversão da  
15 resistência em células que superexpressam ABCG2, um ensaio de viabilidade celular (teste MTT) em que, tanto as células que superexpressam ABCG2 (HEK293ABCG2), quanto as células HEK293 controle (transfectadas com o vetor vazio) foram tratadas com mitoxantrona ou SN-38 (quimioterápicos utilizados na clínica para o  
20 tratamento de diferentes tipos de câncer). As células HEK293ABCG2 tratadas com os quimioterápicos (mitoxantrona e SN-38) também foram co-tratadas com o MBL-II-141 nas concentrações de 0,2 e 1  $\mu$ M.

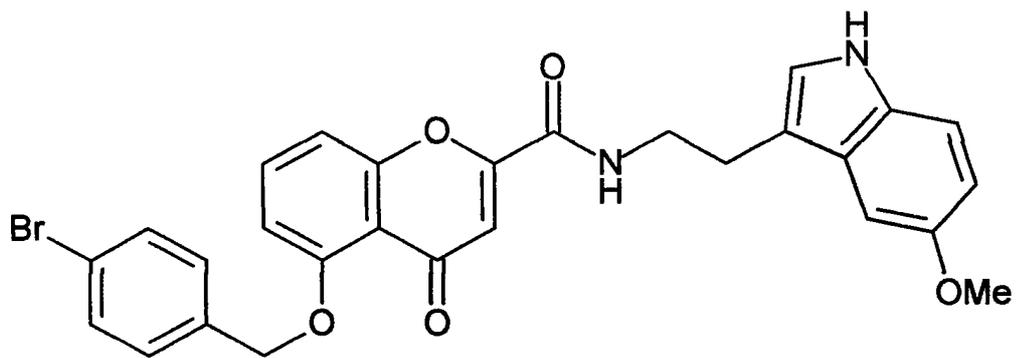
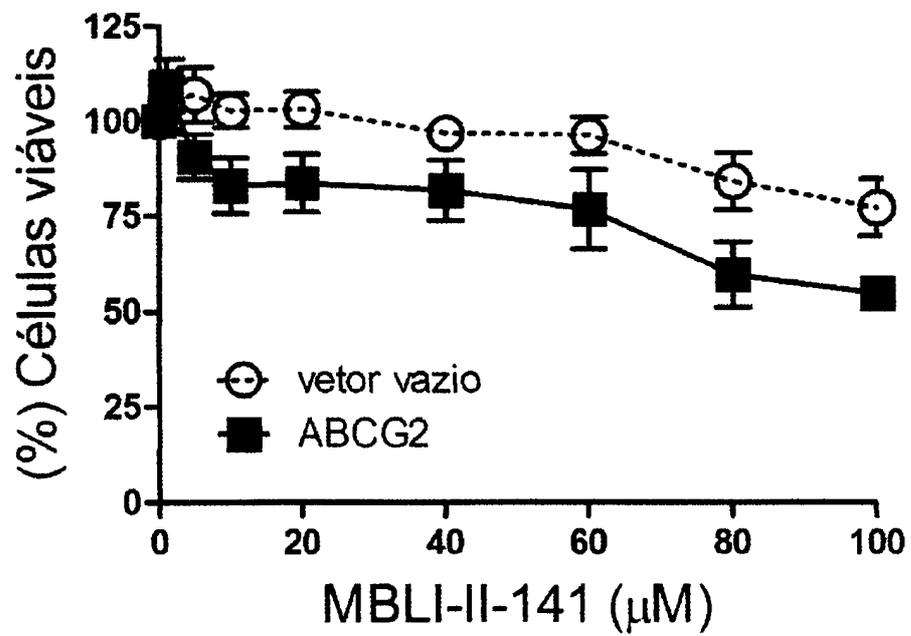
Como observado na figura 3, tanto o tratamento com mitoxantrona quanto com SN-38 promovem diminuição da viabilidade  
25 de células HEK293 controle, apresentando um efeito dose-dependente. Entretanto, em células HEK293ABCG2 tratadas com os quimioterápicos (mitoxantrona e SN-38) pode-se observar claramente um fenótipo de resistência. O co-tratamento de mitoxantrona com o MBL-II-141 foi capaz de reverter completamente este fenótipo de resistência (figura

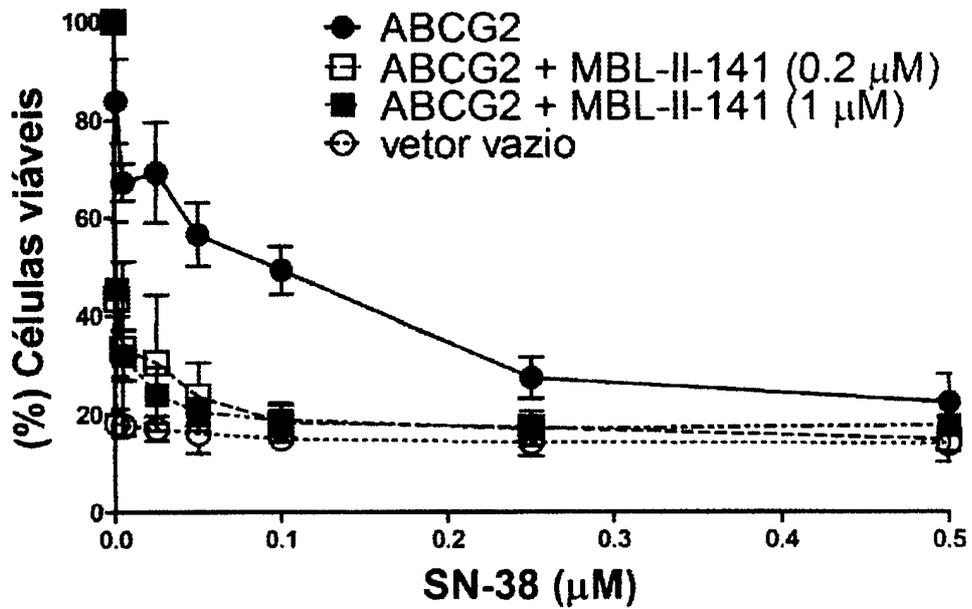
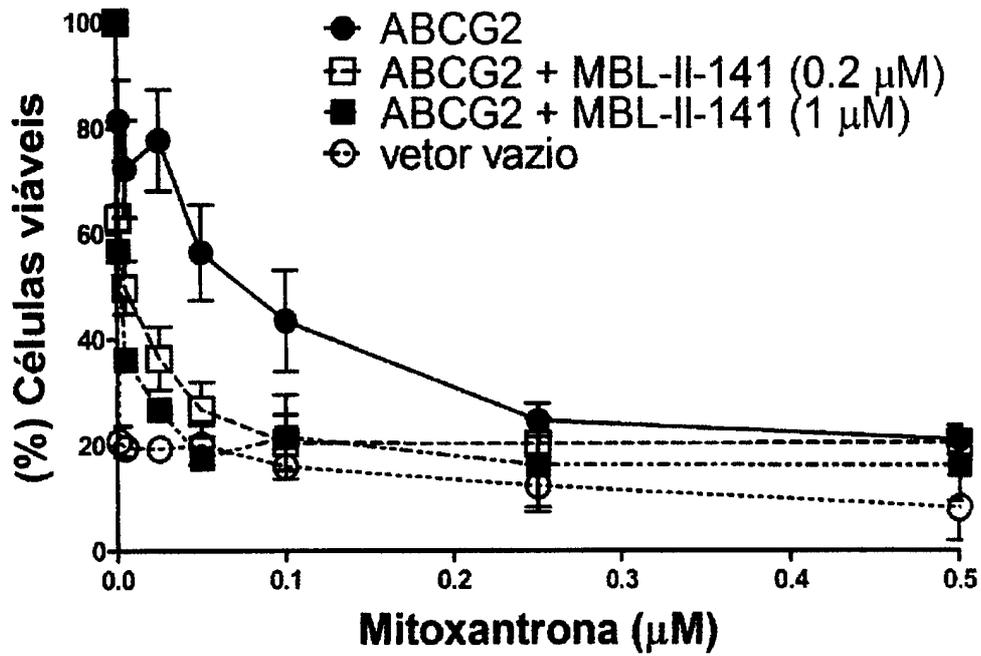
3). O mesmo resultado foi observado quando o quimioterápico mitoxantrona foi substituído por SN-38 (figura 3). Estes resultados confirmam que o MBL-II-141 é capaz de reverter a resistência ao tratamento quimioterápico em células que superexpressam o

5 transportador ABCG2.

**REIVINDICAÇÕES**

- 1- **USO DO MBL-II-141** caracterizado por ser para preparar um medicamento para o tratamento do câncer.

**Figura 1****Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**