



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

(11) BR 102013031043-3 B1

(22) Data do Depósito: 02/12/2013

(45) Data de Concessão: 13/03/2018



(54) Título: USO DE COMPOSTOS QUÍMICOS CAPAZES DE INIBIR A AÇÃO TÓXICA DAS ESFINGOMIELINASES D DO VENENO DE ARANHAS LOXOSCELES E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS REFERIDOS COMPOSTOS

(51) Int.Cl.: A61K 31/404; A61K 31/435; A61P 39/02

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO BUTANTAN

(72) Inventor(es): DENISE VILARINHO TAMBOURGI; PRISCILA HESS LOPES; MARIO TYAGO MURAKAMI; RUTE MARIA GONÇALVES DE ANDRADE

Relatório Descritivo de Patente de Invenção para: **"USO DE COMPOSTOS QUÍMICOS CAPAZES DE INIBIR A AÇÃO TÓXICA DAS ESFINGOMIELINASES D DO VENENO DE ARANHAS LOXOSCELES E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS REFERIDOS COMPOSTOS"**.

Campo da Invenção

A presente invenção se refere ao uso de compostos químicos capazes de inibir a ação tóxica das Esfingomielinases D dos venenos de aranhas *Loxosceles*. Mais especificamente, a presente invenção se refere ao uso das benzenossulfonamidas e benzenossulfonatos na inibição da ação tóxica das Esfingomielinases D dos venenos de aranhas *Loxosceles*.

Antecedentes da Invenção

O Loxoscelismo (acidente por aranha marrom) tem sido descrito em vários continentes. Corresponde à forma mais grave de araneísmo no Brasil. A maioria dos acidentes notificados se concentra no sul do país, particularmente, Paraná e Santa Catarina. O acidente atinge mais comumente adultos, com discreto predomínio em mulheres, ocorrendo no intradomicílio. Observa-se uma distribuição centrípeta das picadas, acometendo mais a coxa, tronco ou braço.

O componente mais importante do veneno das *Loxosceles* é a esfingomielinase D que atua sobre a

matriz extracelular, e através da ativação do sistema complemento e de ações sobre células endoteliais, epiteliais, leucócitos e plaquetas leva a liberação de mediadores inflamatórios, obstrução de pequenos vasos no local da inoculação do veneno, e consequente lesão tecidual. Da mesma forma, a hemólise tem sido atribuída à ação da esfingomielinase-D sobre metaloproteinases endógenas. Uma vez ativadas, estas agem sobre proteínas da membrana de hemácias, tornando-as susceptíveis a ação do complemento.

O Pedido de patente brasileiro PI 0514809-0 A, depositado em 29 de agosto de 2005 em nome de Universidade Nacional Autónoma de México) e Laboratorios Silanes S.A. de C.V. e intitulado: "*Imunógeno e antiveneno contra o veneno da aranha marrom*" descreve o isolamento, caracterização e expressão de fragmentos de DNA codificantes das Esfingomielinases D de 3 espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*: *L. boneti*, *L. reclusa* e *L. laeta* e seu uso como imunógeno para a produção de anticorpos neutralizantes do veneno correspondente e de fragmentos F(ab')₂ respectivos. O referido documento PI 0514809-0 também relata o uso de Esfingomielinases D recombinantes como parte de uma matriz antigênica útil na imunopurificação de anticorpos e seus fragmentos como parte de um dispositivo diagnóstico para

envenenamento por uma aranha do gênero *Loxosceles*.

Como pode ser observado, o documento PI 0514809-0 descreve basicamente a produção de Esfingomielinases recombinantes para a produção de anticorpos neutralizantes
5 contra o veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* e o seu uso em composições para o tratamento de envenenamento por essas aranhas. Em nenhum momento o referido documento PI 0514809-0 descreve ou muito menos sugere o uso de compostos inibidores da classe das benzeno sulfonamidas e cloro
10 benzeno sulfonatos para o tratamento de sintomas associados com o Loxoscelismo provocado pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*.

O pedido de patente internacional WO 01/74343, depositado em 30 de março de 2001, publicado em 11 de
15 outubro de 2001; em nome de 3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY e intitulado: "*Method for the treatment of dermal lesions caused by envenomation*" se refere a um método de tratamento de lesões cutâneas causadas por envenenamento compreendendo a aplicação no local da lesão de uma
20 quantidade terapeuticamente eficaz de um composto modificador da resposta imune selecionado do grupo consistindo de amins de imidazoquinolina, amins de imidazopiridina, amins ciclo alquil imidazopiridina 6,7-fundidas, amins imidazonaftiridina, amins tetrahidro

naftiridina imidazo, amins oxazolopiridines, amins oxazoloquinoline, amins tiazolopirimidina, amins tiazoloquinoline e amins de imidazoquinolina ligadas em ponte-1,2.

5 Como observado, o pedido de patente internacional WO 01/74343 prevê unicamente o uso de compostos modificadores da resposta imune (IRMs) conhecidos mencionados acima, capazes de estimular a resposta imune inata e adquirida, para o tratamento de lesões cutâneas provocadas por
10 envenenamento provocado, por exemplo, por picadas de aranhas do gênero *Loxosceles*, entre outros. O referido pedido de patente internacional WO 01/74343 não menciona nem sugere o uso de compostos inibidores específicos para as Esfingomielinases D presentes no veneno de aranhas do
15 gênero *Loxosceles* para o tratamento das lesões cutâneas e/ou prevenção do desenvolvimento de Loxoscelismo.

 O pedido de patente internacional WO 2007/149343, depositado em 15 de junho de 2007, publicado em 27 de dezembro de 2007; em nome de THE BOARD OF TRUSTEES OF THE
20 LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY e intitulado: "*Proteases for treatment of venomous bites*" se refere a materiais e métodos, incluindo kits, para o uso no tratamento de picadas de cobras, picadas de abelhas, picadas de aranhas, e outras formas de envenenamento ou exposição a toxinas. Os

materiais e métodos envolvem o uso de proteases associadas com mecanismo protetor de degranulação de mastócitos, associadas a uma redução nos efeitos tóxicos e aumento da taxa de sobrevivência em modelos animais. As proteases utilizadas são selecionadas do grupo contendo quimases (especificidade ao substrato semelhante a quimiotripsina), carboxipeptidase A, carboxipeptidase B, triptases (especificidade ao substrato semelhante a tripsina), quimiotripsina ou papaína.

10 Apesar do pedido de patente internacional WO 2007/149343 utilizar nos seus exemplos de concretização tratamento por envenenamento da aranha *Loxosceles reclusa*, o referido pedido de patente internacional WO 2007/149343 não prevê o uso de um composto inibidor específico para a
15 Esfingomielinase D de aranhas do gênero *Loxosceles*.

O Pedido de patente internacional WO 2008/022771, depositado em 21 de agosto de 2007, publicado em 28 de fevereiro de 2008; em nome de NOVARTIS AG e intitulado: "*Amides as sphingomieline inhibitors*" descreve formulação
20 que prevê o uso de inibidores de Esfingomielinase ácida para o tratamento de transtornos mediados pela atividade da Esfingomielinase acida presentes no lisossoma das células de mamíferos, tais como doenças autoimunes, doenças que envolvem apoptose anormal, e crescimento de tumores, por

exemplo. Portanto, não é descrito no referido documento quaisquer compostos com capacidade de inibir especificamente a ação tóxica das Esfingomielinases D provenientes dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, controlando o desenvolvimento do Loxoscelismo cutâneo e sistêmico.

O pedido de patente norte-americano US 2010/0099881 A1 (correspondente do pedido internacional PCT/JP2008/053936), depositado em 07 de dezembro de 2009, publicado em 22 de abril de 2010; em nome de Mugio Nishizawa, Hiroshi Imagawa, Jun Sakurai, Masataka Oda e Otsuka Chemical CO. LTD. E intitulado: "*Sphingosine compound, method for producing the same, and sphingomyelinase inhibitor*" revela somente composto Esfingosina novo, com atividade inibitória da ação da Esfingomielinase adequada para o uso como medicamento para o tratamento ou prevenção de hemorragia cerebral, infarto cerebral e doenças cerebrovasculares semelhantes, ferimentos na cabeça, demência senil, representado por doença de Alzheimer e Parkinson entre outras doenças degenerativas semelhantes, diabetes, obesidade, arteriosclerose, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, câncer, doença renal e doenças cardíacas.

O artigo; publicado em *Journal of Investigative Dermatology* (2007), volume 127, páginas 1410 a 1418,

disponível online em 11 de janeiro de 2007, Autores: Danielle Paixão-Cavalcante, Carmem W. van der Berg, Rute M. Gonçalves-de-Andrade, Matheus de F. Fernandes-Pedrosa, Cinthya Kimori Okamoto e Denise V. Tambourgi, intitulado:

5 "*Tetracycline protects against dermonecrosis induced by loxosceles spider venom*" se refere ao uso de antibióticos da classe das tetraciclinas clássicas (tetraciclina, doxiciclina e minociclina) na inibição ou redução de lesões dermonecróticas e nos mecanismos envolvidos com o

10 desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo induzidos pelo veneno de aranhas *Loxosceles* através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Segundo o referido documento, o tratamento tópico é mais eficiente na prevenção ou redução das lesões dermonecróticas do que o tratamento oral (sistêmico)

15 possivelmente pela concentração de tetraciclinas utilizadas, que em alta concentração sistêmica pode levar a toxicidade. De acordo com o dito documento, a ligação de Esfingomielinase D proveniente do veneno de aranhas *Loxosceles* à superfície celular induz a expressão e

20 ativação de metaloproteinases (MMPs) endógenas. Assim, o mecanismo de ação proposto no documento envolve a ação inibitória das tetraciclinas sobre metaloproteinases (MMPs), cuja expressão e ativação são induzidas pelo veneno de aranhas *Loxosceles*. Em nenhum momento o dito documento

se refere ao uso de compostos da classe das benzeno sulfonamidas e cloro benzeno sulfonatos com propósitos semelhantes.

Como pode ser observado nenhum documento do estado da
5 técnica descreve ou muito menos sugere o uso de compostos inibidores da classe das benzenossulfonamidas e benzenossulfonatos para o tratamento de sintomas associados com o Loxoscelismo provocado pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*.

10 Sumário da Invenção

Para solucionar os problemas acima mencionados, a presente invenção propiciará vantagens significativas em relação ao uso de compostos inibidores da classe das benzenossulfonamidas e benzenossulfonato para o tratamento
15 de sintomas associados com o Loxoscelismo provocado pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*, possibilitando um aumento do seu desempenho e apresentando uma relação custo/benefício mais favorável.

A presente invenção se refere ao uso de compostos
20 inibidores da classe das benzenossulfonamidas e benzenossulfonato com atividade inibitória sobre as esfingomielinases D dos venenos de aranhas *Loxosceles* na para preparação de um medicamento para atuar sobre a atividade hidrolítica da toxina Esfingomielinase D (SMase

D) recombinante e do veneno da aranha marrom *Loxosceles laeta*.

A presente invenção se refere, preferencialmente, ao uso do 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il)metilenoamino] benzenosulfonamida e do 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo[3,4-b]furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato, (compostos 5 e 6, respectivamente), os quais são compostos capazes de inibir a ação tóxica da esfingomielinases D do veneno de *Loxosceles*, controlando o desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo e sistêmico; redução de hemólise, inibir a lesão cutânea, inibir a dermonecrose, inibir vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio.

Além do potencial terapêutico, tais inibidores podem ser usados como ferramentas no estudo da ação de esfingomielinases e fosfolipases D.

Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a composição farmacêutica para o tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibir a lesão cutânea, inibir a dermonecrose, inibir vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio, a qual compreende um composto da classe benzenossulfonamida e um veículo farmacêuticamente aceitável. O composto da classe benzenossulfonamida sendo, preferencialmente, o composto 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il)metilenoamino]

benzenossulfonamida.

Um terceiro aspecto da presente invenção se refere a uma composição farmacêutica para o tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibir a lesão cutânea, 5 inibir a dermonecrose, inibir vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio, a qual compreende um composto da classe benzenossulfonato e um veículo farmacêuticamente aceitável. O composto da classe benzenossulfonato sendo, preferencialmente, o 10 composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridil metileno)benzo[3,4-b]furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato

Breve Descrição dos Desenhos

A estrutura e operação da presente invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser mais 15 bem entendidas mediante referência aos desenhos em anexo e a seguinte descrição:

A Figura 1 mostra a fórmula estrutural do composto 5 - 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il)metileneamino] benzenosulfonamida;

20 A Figura 2 mostra a fórmula estrutural do composto 6 - 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo[3,4-b]furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato;

A Figura 3 mostra um gráfico indicando a capacidade de inibição da atividade hidrolítica das esfingomielinases

recombinantes e presentes no veneno de *Loxosceles laeta*, sobre o substrato esfingomielina (SM), pelos compostos 5 e 6;

A figura 4 mostra um gráfico indicando a capacidade de inibição da atividade hidrolítica das esfingomielinases recombinantes e presentes no veneno de *Loxosceles laeta*, sobre o substrato lisofosfatidilcolina (LPC), pelos compostos 5 e 6;

As figuras 5 (a) e 5 (b) mostram as curvas dose-resposta dos compostos 5 e 6 na inibição da atividade hidrolítica sobre SM, com base nas quais foram calculados os valores de IC_{50} dos compostos;

A figura 6 apresenta a porcentagem de inibição da remoção das glicoforinas C da superfície de eritrócitos pelos compostos 5 e 6, evento crucial no desenvolvimento da hemólise dependente de Sistema Complemento observada nos envenenamentos;

A figura 7 mostra a porcentagem de inibição da ligação das esfingomielinases D à superfície dos eritrócitos, pelos compostos 5 e 6;

As figuras 8 e 9 representam a capacidade dos compostos 5 e 6 de reduzir a morte de queratinócitos humanos, induzida pelas esfingomielinases recombinantes e presentes no veneno de *L. laeta*;

A figura 10 mostra a porcentagem de inibição da ligação das esfingomielinases recombinantes e presentes no veneno à membrana celular de queratinócitos humanos, pelos compostos 5 e 6;

5 A figura 11 descreve a porcentagem de inibição da produção/secreção de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e 9) por queratinócitos humanos tratados com as esfingomielinases D recombinantes promovida pelos compostos 5 e 6;

10 A figura 12 mostra a porcentagem de inibição do desenvolvimento das lesões dermonecróticas em coelhos, analisadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação do veneno, pelos compostos 5 e 6;

15 A figura 13 representa a porcentagem de inibição da ativação da via de sinalização intracelular MAPK ERK1/2 em queratinócitos humanos tratados com as esfingomielinases D recombinantes, pelos compostos 5 e 6;

20 A figura 14 mostra a porcentagem de inibição da produção do íon superóxido por queratinócitos humanos tratados com as esfingomielinases D recombinantes, pelos compostos 5 e 6;

A figura 15 demonstra a porcentagem de inibição da produção de citocinas TNF- α e TGF- β 1 por queratinócitos humanos tratados com as esfingomielinases D recombinantes,

pelos compostos 5 e 6;

A figura 16 apresenta a média de inibição de todas as atividades testadas para os compostos 5 e 6; e

O anexo 1 mostra microfotografias da análise histopatológica da pele de coelhos inoculados com o veneno de *L. laeta* ou com o veneno incubados com os compostos 5 e 6.

Descrição Detalhada da Invenção

Embora a presente invenção possa ser suscetível a diferentes modalidades, é mostrada nos desenhos e na seguinte discussão detalhada, uma modalidade preferida com o entendimento de que a presente modalidade deve ser considerada uma exemplificação dos princípios da invenção e não pretende limitar a presente invenção ao que foi ilustrado e descrito aqui.

A presente invenção se refere ao uso de compostos inibidores da classe das benzenossulfonamidas e benzenossulfonato com atividade inibitória sobre as esfingomielinases D dos venenos de aranhas *Loxosceles na* para preparação de um medicamento para atuar sobre a atividade hidrolítica da toxina Esfingomielinase D (SMase D) recombinante e do veneno da aranha marrom *Loxosceles laeta*.

A presente invenção se refere, preferencialmente, ao

uso do 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il)metileneamino] benzenosulfonamida, denominado composto 5, (Figura 1) e do 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno)benzo[3,4-b]furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato, denominado composto 6, (Figura 5 2), os quais são compostos capazes de inibir a ação tóxica da esfingomielinases D do veneno de *Loxosceles*, controlando o desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo e sistêmico, tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibir a lesão cutânea, inibir a dermonecrose, inibir vias de 10 sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio. Além do potencial terapêutico, tais inibidores podem ser usados como ferramentas no estudo da ação de esfingomielinases e fosfolipases D.

Os compostos inibidores da presente invenção podem ser 15 usados como ferramentas no estudo da ação de esfingomielinases e fosfolipases D, assim como, os referidos compostos inibidores têm potencial terapêutico para os envenenamentos por aranhas *Loxosceles* e nas infecções por microorganismos produtores de SMases.

20 **Seleção dos compostos**

Os ligantes utilizados nos estudos de *Docking* molecular foram selecionados a partir de um banco de dados gratuito de moléculas comercialmente disponíveis, o ZINC Database (www.zinc.docking.org). Muitos ligantes neste

banco de dados estão disponíveis em vários formatos 3D imediatamente utilizáveis por muitos programas populares de *docking*.

Além das propriedades físico-químicas importantes, o banco contém informações de fornecedores e números de catálogo original para cada fonte comercial desse composto. É possível encontrar também informações sobre função ou atividades já estudadas para o composto, quando disponíveis.

10 ***Estudos de Docking molecular***

Estudos de *docking* molecular, para a seleção de inibidores de SMases D, foram conduzidos no Laboratório Nacional de Luz Síncroton, Campinas - São Paulo, com o auxílio de softwares ICM - Molsoft (baseado no algoritmo de Monte Carlo), Molegro Virtual Docker (baseado em um algoritmo de busca heurístico que combina evolução diferencial com um algoritmo de predição de cavidade) e GOLD (baseado em um algoritmo genético). As análises de *docking* foram realizadas com base na estrutura 3D da SMase I do veneno de *L. laeta* conforme o artigo de MURAKAMI, M. T.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; TAMBOURGI, D. V.; ARNI, R. K. e intitulado "*Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D*" publicado no J. Biol. Chem., v. 280, n. 14, p. 13658-13664,

2005 e incorporado aqui por referência.

Os tópicos seguintes descrevem a ação dos compostos 4-bromo-*N*-[(*E*)-(2-metil-1*H*-indol-3-il)metileneamino]benzenosulfonamida (Figura 1) e 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno)benzo[3,4-*b*]furano-6-il 4-cloro benzenossulfonato (Figura 2), denominados como compostos 5 e 6 da presente invenção, nos mecanismos que permeiam o desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo e sistêmico.

Análise da ação inibitória dos compostos 5 e 6 sobre a atividade hidrolítica da toxina e do veneno.

Os compostos 5 e 6 da presente invenção foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e preparados em uma solução estoque de alta concentração, a qual foi diluída em solução salina estéril para as concentrações utilizadas em cada ensaio.

Nos ensaios de fluorimetria, a fluorescência basal dos compostos foi medida e descontada nestes ensaios.

Foi analisada a capacidade dos compostos na concentração de 40 µM, em inibir a atividade hidrolítica da toxina Esfingomielinase D (SMase D) recombinante e do veneno de *Loxosceles laeta* sobre os substratos Esfingomielina (SM) e Lisofosfatidilcolina (LPC) por ensaios de fluorimetria.

A Figura 3 mostra a porcentagem de inibição dos

compostos 5 e 6 sobre a atividade hidrolítica das SMases D recombinantes e presentes no veneno de *L. laeta*, sobre o substrato esfingomielina (SM).

Os resultados mostraram que o composto 5 da presente invenção inibe em 45,7% e 53% a atividade da toxina recombinante e do veneno de *L. laeta*, respectivamente, sobre o substrato SM. O composto 6 da presente invenção inibiu em 51% e 22,7% a atividade da toxina recombinante e do veneno, respectivamente.

10 A Figura 4 mostra a porcentagem de inibição dos compostos 5 e 6 sobre a atividade hidrolítica das SMases D recombinantes e presentes no veneno de *L. laeta*, sobre o substrato lisofosfatidilcolina (LPC).

Em relação ao substrato LPC, o composto 5 da presente invenção reduz em 38,6% e 44,4% a atividade da toxina recombinante e do veneno, respectivamente. Já o composto 6 da presente invenção, reduz em 34 e 16% esta atividade.

As Figuras 5 (a) e 5 (b) mostram as curvas dose-resposta da inibição da atividade hidrolítica das SMases D recombinantes sobre o substratos esfingomielina, pelos compostos 5 e 6, respectivamente. Com base nestas curvas foi calculado o IC₅₀ dos compostos.

Com base nas referidas curvas dose-resposta da ação dos compostos sobre a atividade da toxina recombinante

sobre o substrato SM, foram obtidos os valores de IC_{50} , sendo de $45,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$ para o composto 5 da presente invenção e $63,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$ para o composto 6 da presente invenção.

5 A análise do mecanismo de inibição mostrou que os compostos 5 e 6 da presente invenção podem ser classificados como inibidores de ação incompetitiva com valores de K_i de 1,63 e 1,73 μM , respectivamente.

Análise da ação dos compostos 5 e 6 da presente invenção
10 ***sobre a hemólise induzida pelo veneno de Loxosceles***

A remoção das glicoforinas da superfície de eritrócitos pela ação indireta da toxina é um evento crucial para o desenvolvimento da hemólise intravascular presente nos acidentes.

15 A Figura 6 mostra a porcentagem de inibição da remoção de Glicoforinas C da superfície de eritrócitos humanos induzida pelas SMases D presentes no veneno de *L. laeta*.

A análise da expressão de glicoforina C na superfície de eritrócitos humanos por citometria de fluxo, mostrou que
20 na presença dos compostos 5 e 6 da presente invenção (40 μM), a remoção destas moléculas da superfície das células é reduzida em 92,6 e 88,2%, respectivamente.

A Figura 7 mostra a um gráfico indicando a porcentagem de inibição da ligação das SMases D presentes no veneno de

L. laeta à superfície de eritrócitos humanos

Este evento de remoção da glicoforina C é associado à ligação da toxina na membrana do eritrócito. Desta forma, a ligação da toxina à superfície da célula foi analisada por citometria de fluxo e os resultados indicaram uma redução da ligação de 96,8 e 84% na presença dos compostos 5 e 6, da presente invenção, respectivamente.

Análise da ação dos compostos 5 e 6 da presente invenção sobre os mecanismos do loxoscelismo cutâneo

10 O desenvolvimento da lesão cutânea vista no loxoscelismo está intimamente relacionada à morte celular de queratinócitos induzida pela SMase D.

A Figura 8 mostra a Viabilidade de queratinócitos humanos tratados somente com SMase D recombinante ou 15 incubada com os compostos 5 e 6. A análise da viabilidade celular pelo método de MTT *in vitro*, após tratamento com a toxina recombinante ou com o veneno mostrou que na presença do composto 5 da presente invenção a viabilidade das células tratadas com a toxina aumenta de 20,23 para 55,75% 20 e na presença do composto 6 da presente invenção aumenta para 53,55%.

A Figura 9 mostra a viabilidade de queratinócitos humanos tratados somente com veneno de *L. laeta* ou com veneno incubado com os compostos 5 e 6. As células tratadas

com veneno tiveram sua viabilidade aumentada de 36,7 para 45,9% com o composto 5 da presente invenção e para 59,26% com o composto 6 da presente invenção. Para estes ensaios os compostos 5 e 6 da presente invenção foram utilizados na
5 concentração de 10 μ M.

Assim como em eritrócitos, a morte celular de queratinócitos está associada à ligação da toxina na membrana desta célula.

A Figura 10 mostra um gráfico indicando a porcentagem
10 de inibição da ligação das SMases D recombinantes e presentes no veneno de *L. laeta* à superfície de queratinócitos humanos. A análise deste parâmetro por citometria de fluxo mostrou que a ligação da toxina recombinante é reduzida em 54,9% com o composto 5 da
15 presente invenção e 50,77% com o composto 6 da presente invenção, ambos na concentração de 40 μ M. Já a ligação das SMases presentes no veneno é reduzida em 63,8 e 25,6% na presença dos compostos 5 e 6, respectivamente.

Outro evento associado à morte dos queratinócitos
20 durante o desenvolvimento da lesão cutânea é a produção das metaloproteinases de matriz extracelular 2 e 9 (MMPs). Desta forma, os sobrenadantes de cultura dos queratinócitos tratados com o veneno de *L. laeta* foram investigados por ELISA quanto à presença de MMP-2 e 9. Na presença dos

compostos 5 e 6 da presente invenção (10 μ M) a secreção de MMP-2 é reduzida em 81 e 98,4%, respectivamente. Em relação à MMP-9, ambos os compostos inibem completamente a secreção desta MMP.

5 A Figura 11 mostra um gráfico indicando a porcentagem de inibição da produção/secreção de MMP-2 e 9 pelos queratinócitos humanos tratados com o veneno de *L. laeta*

Após a análise dos aspectos que permeiam o desenvolvimento da lesão cutânea, foi verificada então, a
10 capacidade dos compostos em inibir a dermonecrose *in vivo*, utilizando um modelo em coelhos.

Após 24 horas da inoculação do veneno, a lesão foi reduzida em 61,8 e 36% na presença dos compostos 5 e 6 da presente invenção, respectivamente. Em 48 horas, a inibição
15 foi de 60 e 45% e em 72 horas foi de 56 e 49% na presença destes dois compostos.

A Figura 12 mostra um gráfico indicando a porcentagem de inibição das lesões dermonecroticas desenvolvidas em coelhos pela inoculação do veneno de *L. laeta*

20 A análise histopatológica das peles dos coelhos inoculados com o veneno na presença ou ausência destes compostos demonstra que na presença dos compostos 5 e 6 da presente invenção há uma redução na desorganização das fibras colágenas da derme, ausência de hemorragia e

infiltrado inflamatório, bem como de lesão na camada muscular adjacente em relação àquele inoculado apenas com o veneno.

O Anexo 1 mostra microfotografias da análise histopatológica da pele de coelhos inoculados somente com o veneno de *L. laeta* ou com o veneno incubado com os compostos 5 e 6.

Os compostos 5 e 6 da presente invenção foram utilizados na concentração correspondente a três vezes o valor do IC₅₀ (136,2 µM para o composto 5 e 190,2 µM para o 6).

Ação dos compostos 5 e 6 da presente invenção sobre outros mecanismos envolvidos na ação tóxica das esfingomielinases

D do veneno de Loxosceles

A Figura 13 mostra a porcentagem de inibição da ativação da via de sinalização intracelular MAPK ERK1/2 induzida pelas SMases D recombinantes. A toxina mostrou-se capaz de induzir a ativação da via de sinalização intracelular das MAPKs, mais especificamente, a ERK1/2 em queratinócitos. Em ensaios de ELISA verificou-se que na presença dos compostos 5 e 6 da presente invenção (40 µM) a de ERK1/2 fosforilada foi reduzida em 65,8 e 80,2%, respectivamente.

Outro aspecto analisado foi a produção de espécies

reativas do oxigênio por queratinócitos tratados com a toxina, utilizando a técnica de citometria de fluxo.

A Figura 14 mostra porcentagem de inibição da produção do íon superóxido por queratinócitos tratados com as SMases D recombinantes

Os resultados indicam que na presença dos compostos 5 e 6 da presente invenção (40 μ M), a produção de superóxido por estas células foi inibida em 70,7 e 92,7%, respectivamente.

Além disso, a expressão do receptor de TNF na superfície de queratinócitos tratados com a toxina foi analisada por citometria de fluxo. O tratamento com a toxina leva a uma remoção do receptor da superfície da célula e esta é revertida em 27,7% na presença do composto 5 da presente invenção (40 μ M).

A produção de citocinas por queratinócitos pode ser um aspecto importante no desenvolvimento da lesão cutânea do loxoscelismo.

A Figura 15 mostra a porcentagem de inibição da produção de citocinas por queratinócitos humanos tratados com as SMases D recombinantes. A investigação pela técnica de ELISA, nos sobrenadantes de cultura dos queratinócitos tratados com a toxina mostrou que a mesma induz a produção de TNF- α , a qual foi reduzida em 73,9 e 61,1% na presença

dos compostos 5 e 6 (10 μ M), respectivamente. Outra citocina encontrada foi o TGF- β 1, sendo esta reduzida em 88,3 e 89,2% na presença dos compostos.

A Figura 16 mostra um gráfico indicando a eficiência dos compostos 5 e 6 na inibição dos mecanismos envolvidos na ação tóxica das SMases D e no desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo e sistêmico.

Desta forma, levando em consideração todos os aspectos analisados, o composto 5 da presente invenção detém uma eficiência de 61,1%, enquanto o composto 6 da presente invenção de 54,1% sobre os mecanismos envolvidos na ação tóxica das SMases D no desenvolvimento do loxoscelismo.

Sendo assim, os compostos 5 e 6 da presente invenção podem ser utilizados:

15 ➤ Para preparação de um medicamento para atuar sobre a atividade hidrolítica da toxina Esfingomielinase D (SMase D) recombinante e do veneno da aranha marrom *Loxosceles laeta*;

20 ➤ Para preparação de um medicamento para atuar na redução de hemólise,

 ➤ Para preparação de um medicamento para inibir a lesão cutânea,

 ➤ Para preparação de um medicamento para inibir a dermonecrose,

➤ Para preparação de um medicamento para inibir mecanismos envolvidos na ação tóxica das SMases D no desenvolvimento do loxoscelismo;

➤ Para preparação de um medicamento para inibir
5 vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio

Os compostos 5 e 6 da presente invenção, além de atuarem como inibidores de esfingomielinases D do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, podem atuar como uma droga
10 terapêutica complementar para os acidentes e possivelmente como compostos para controle dos efeitos de esfingomielinases bacterianas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus cereus*) e de alguns artrópodes (aranhas, escorpiões e
15 carrapatos).

Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a composição farmacêutica para o tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibir a lesão cutânea, inibir a dermonecrose, inibir vias de sinalização intracelular e
20 produção de espécies reativas de oxigênio, a qual compreende um composto da classe benzenossulfonamida e um veículo farmacêuticamente aceitável. O composto da classe benzenossulfonamida sendo, preferencialmente, o composto 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il)metilenoamino]

benzenossulfonamida.

Um terceiro aspecto da presente invenção se refere a uma composição farmacêutica para o tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibir a lesão cutânea, 5 inibir a dermonecrose, inibir vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio, a qual compreende um composto da classe benzenossulfonato e um veículo farmacêuticamente aceitável. O composto da classe benzenossulfonato sendo, preferencialmente, o 10 composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridil metileno)benzo[3,4-b]furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato.

Por “veículo farmacêuticamente aceitável” é entendido por qualquer veículo, excipiente, diluente aceitável no campo farmacêutico.

15 Assim, embora tenham sido mostradas apenas algumas modalidades da presente invenção, será entendido que várias omissões, substituições e alterações nas classes dos compostos benzenossulfonamidas e benzenossulfonatos podem ser feitas por um técnico versado no assunto, sem se 20 afastar do espírito e escopo da presente invenção.

É expressamente previsto que todas as combinações dos elementos que desempenham a mesma função substancialmente da mesma forma para alcançar os mesmos resultados estão dentro do escopo da invenção. Substituições de elementos de

uma modalidade descrita para outro são também totalmente pretendidos e contemplado.

Também é preciso entender que os desenhos não estão necessariamente em escala, mas que eles são apenas de
5 natureza conceitual. A intenção é, portanto, ser limitada, tal como indicado pelo escopo das reivindicações anexas.

REINVIDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica para o tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibição da lesão cutânea, inibição da dermonecrose, inibição das vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio **caracterizada pelo** fato de que compreende o composto 4-bromo-N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida e um veículo farmacêuticamente aceitável.

2. Composição farmacêutica para o tratamento de Loxoscelismo, redução de hemólise, inibição da lesão cutânea, inibição da dermonecrose, inibição das vias de sinalização intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio **caracterizada pelo** fato de que compreende um composto 4-metil-3-oxo-2- (3-piridil metileno) benzo [3, 4-b] furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato e um veículo farmacêuticamente aceitável.

3. Uso do composto 4-bromo-N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida com atividade inibitória sobre as Esfingomielinases D dos venenos de aranhas Loxosceles **caracterizado pelo** fato de que é para preparação de um medicamento para o tratamento de sintomas associados com o Loxoscelismo provocado pela picada de aranhas do gênero Loxosceles.

4. Uso do composto 4-metil-3-OXO-2-(3-piridilmetileno) benzo [3, 4-b] furan-6-il-4-clorobenzenossulfonato com atividade inibitória sobre as Esfingomielinases D dos venenos de aranhas *Loxosceles* **caracterizado pelo** fato de que é para preparação de um medicamento para o tratamento de sintomas associados com o Loxoscelismo provocado pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il) metileneamino] benzenossulfonamida inibe em 45,7% a atividade da toxina recombinante sobre o substrato SM

6. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-bromo-N-[(E)-(2-metil-1H-indol-3-il) metileneamino] benzenossulfonamida inibe em 53% a atividade do veneno de *L. laeta* sobre o substrato SM.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-metil-3-OXO-2-(3-piridilmetileno) benzo [3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato inibe a atividade da toxina recombinante em 51% sobre o substrato SM.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-metil-3-OXO-2-(3-

piridilmetileno) benzo [3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato inibe a atividade do veneno de L. laeta sobre o substrato SM em 22,7%.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-bromo- N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileneamino] benzenossulfonamida em relação ao substrato LPC reduz em 38,6% a atividade da toxina recombinante.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-bromo- N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-il)metileneamino] benzenossulfonamida em relação ao substrato LPC reduz em 44,4% a atividade do veneno.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo[3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato em relação ao substrato LPC reduz em 34% atividade da toxina recombinante.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o referido composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo[3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato em relação ao substrato LPC reduz em 16% atividade do veneno.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que os valores de IC50 para o

composto 4-bromo-N- [(E)-(2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida é de $45,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$ com base na ação do composto sobre a atividade da toxina recombinante sobre o substrato SM.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que os valores de IC50 para o composto 4-metil-3-oxo-2- (3-piridilmetileno) benzo [3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato é de $63,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$ com base na ação do composto sobre a atividade da toxina recombinante sobre o substrato SM.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a remoção das glicoforinas da superfície de eritrócitos na presença do composto 4-bromo-N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida é de 92,6%.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que a remoção das glicoforinas da superfície de eritrócitos na presença do composto 4-metil-3-oxo-2- (3-piridilmetileno) benzo [3, 4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato é de 88,2 %.

17. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado pelo** fato de que a referida remoção da glicoforina C está associado à ligação da toxina na membrana do eritrócito indicando uma redução da ligação de 96,8% na presença do 4-bromo-N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-

il)metileno amino] benzenossulfonamida e 84% na presença do composto 4-metil-3-oxo-2- (3-piridilmetileno) benzo [3, 4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato, respectivamente.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que após o tratamento com a toxina recombinante na presença do composto 4-bromo-N- [(E) -(2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida a viabilidade das células tratadas com a toxina aumenta de 20,23 para 55, 75% .

19. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que após o tratamento com a toxina recombinante na presença do composto 4-metil-3-oxo-2- (3-piridilmetileno) benzo [3, 4-b] furan-6 -il-4-cloro benzenossulfonato a viabilidade das células tratadas com a toxina aumenta de 20,23 para 53,55%.

20. Uso, de acordo com as reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que as células tratadas com veneno tiveram sua viabilidade aumentada de 36,7 para 45,9% com o composto 4-bromo-N- [(E)-(2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que as células tratadas com veneno tiveram sua viabilidade aumentada de 36,7 para

59,26% com o composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno)benzo [3, 4-b] furan-6 -il-4-cloro benzenossulfonato.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a secreção de metaloproteinases de matriz extracelular 2 (MMP-2) na presença do composto 4-bromo-N- [(E)-(2-metil-1H-indol-3-il)metileno amino] benzenossulfonamida é reduzida em 81%.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que a secreção de metaloproteinases de matriz extracelular 2 (MMP-2) na presença do composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno)benzo [3 , 4-b] furan-6 -il-4-cloro benzenossulfonato é reduzida em 98,4%.

24. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado pelo** fato de que a secreção de metaloproteinases de matriz extracelular 9 (MMP-9) na presença do composto 4-bromo-N- [(E) -(2-metil-1H-indol-3-il)metileno amino] benzenossulfonamida e do composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo [3 , 4-b] furan-6 -il-4-cloro benzenossulfonato é inibida completamente.

25. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado pelo** fato de que na pele com veneno e na presença dos referidos compostos ocorre uma redução na desorganização das fibras colágenas da derme, ausência de

hemorragia e infiltrado inflamatório, bem como de lesão na camada muscular adjacente.

26. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado pelo** fato de que a produção de espécies reativas do oxigênio por queratinócitos tratados com a toxina indica que na presença dos referidos compostos, a produção de superóxido por estas células foi inibida em 70,7% com o composto 4-bromo-N- [(E) -(2-metil-1H-indol-3-il)metileno amino] benzenossulfonamida e 92,7% com composto 4-metil-3-oxo-2- (3-piridilmetileno) benzo [3, 4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato, respectivamente.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a expressão do receptor de TNF na superfície de queratinócitos tratados com a toxina leva a uma remoção do receptor da superfície da célula e esta é revertida em 27,7% na presença do composto 4-bromo-N- [(E)- (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida .

28. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, caracterizado pelo fato de que a produção de TNF- é reduzida em 73,9 e 61,1% na presença dos 4-bromo-N- [(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida e do compôsto4-metil-3-oxo-2- (3-piridilmetileno) benzo [3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato, respectivamente.

29. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado pelo** fato de que a produção de TGF- β I é reduzida em 88,3 e 89,2% na presença do composto 4-bromo-N-[(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida e do composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo [3,4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato, respectivamente.

30. Uso, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizado pelo** fato de que a ERK1/2 fosforilada é reduzida na presença do composto 4-bromo-N-[(E) - (2-metil-1H-indol-3-il) metileno amino] benzenossulfonamida e do composto 4-metil-3-oxo-2-(3-piridilmetileno) benzo [3, 4-b] furan-6-il-4-cloro benzenossulfonato a ERK1/2 fosforilada em 65,8 e 80,2%, respectivamente.

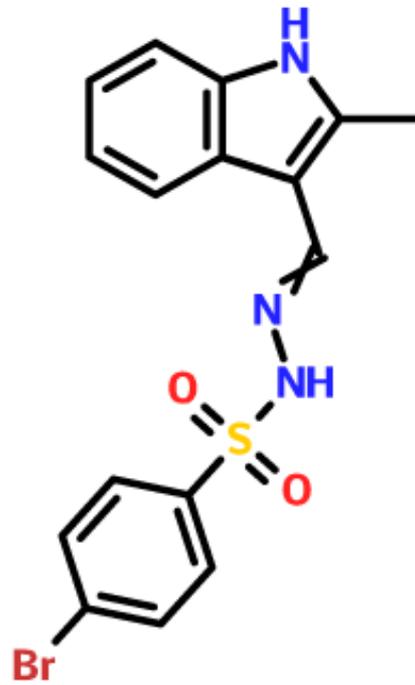


Figura 1

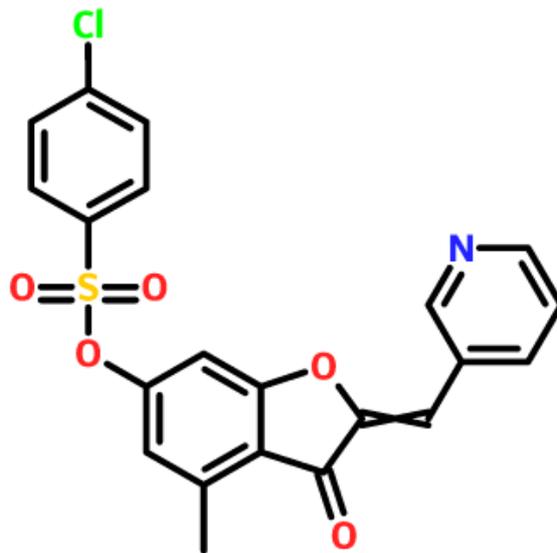


Figura 2

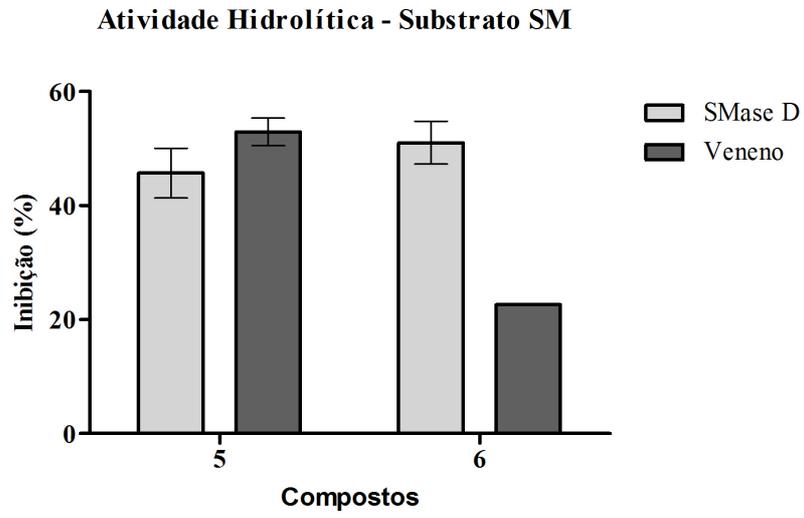


Figura 3

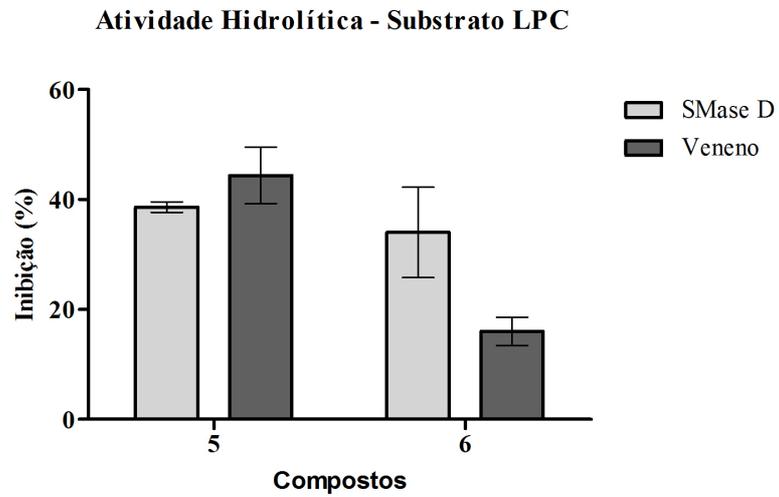


Figura 4

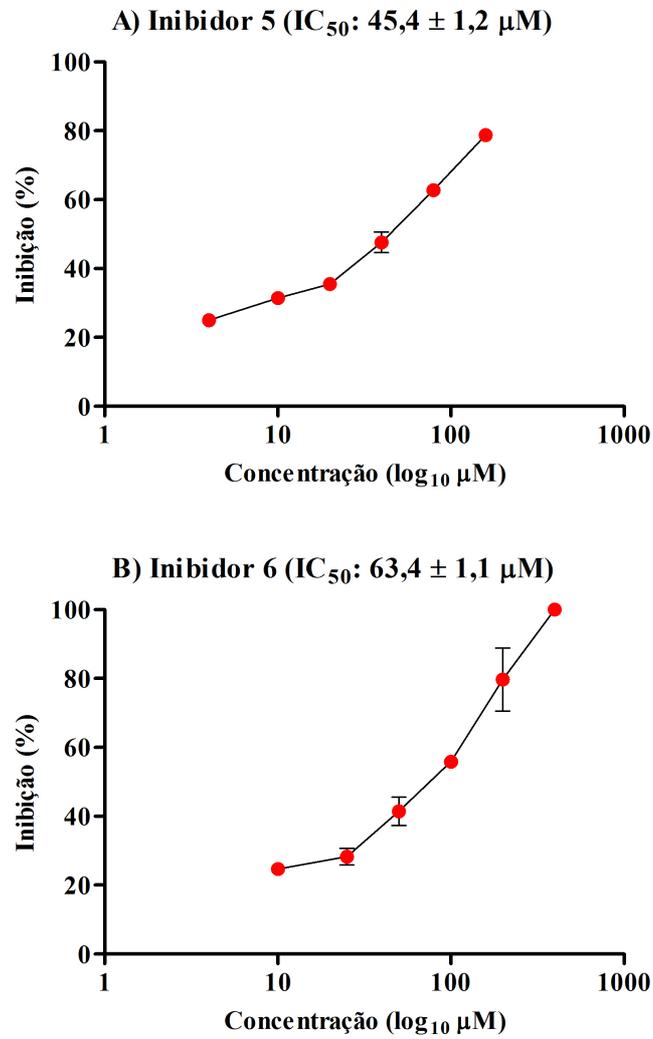
Curvas dose-resposta e IC_{50} dos compostos

Figura 5

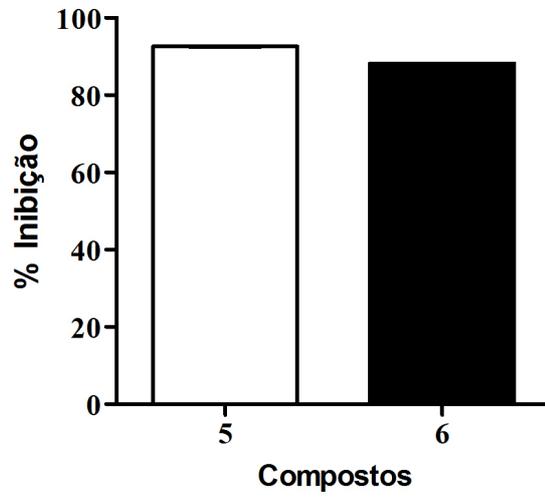


Figura 6

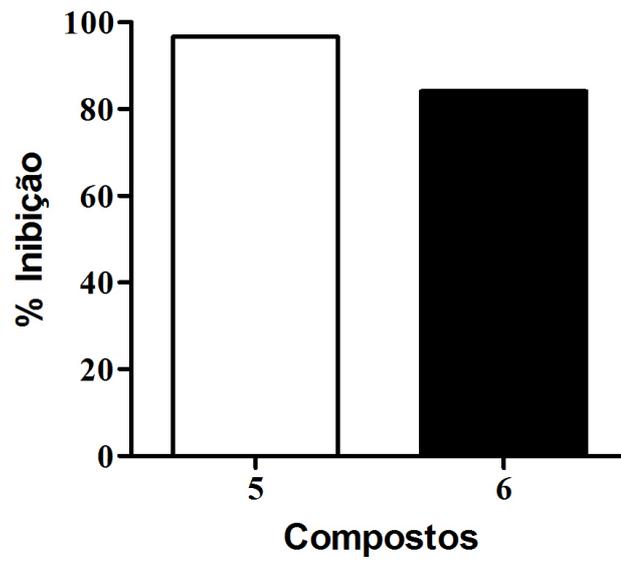


Figura 7

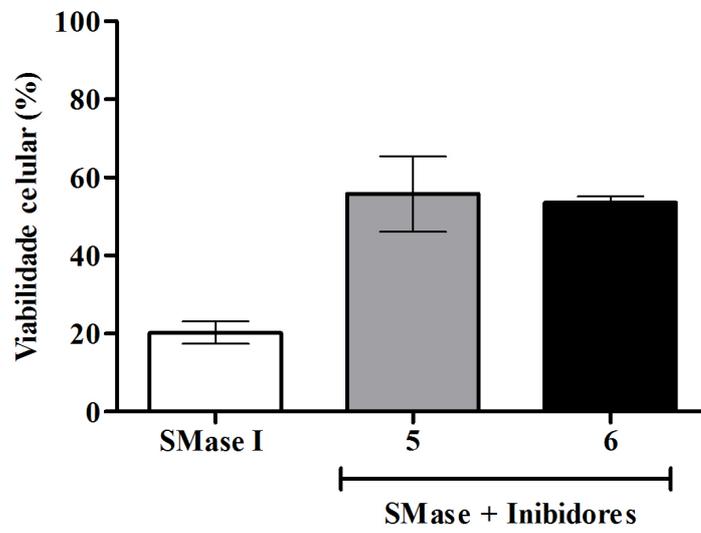


Figura 8

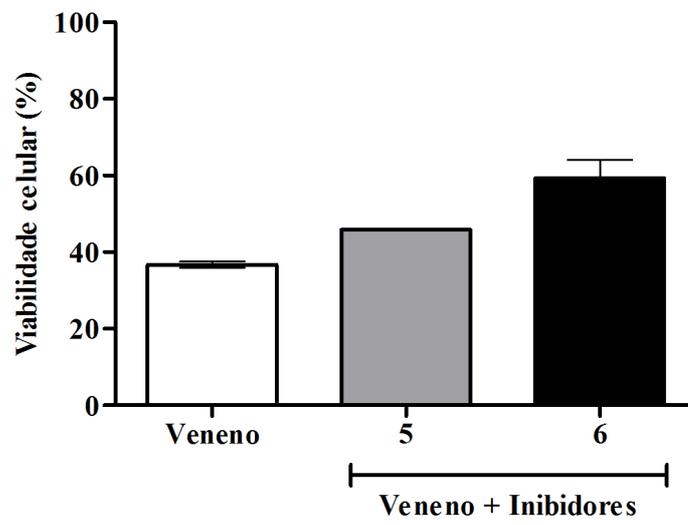


Figura 9

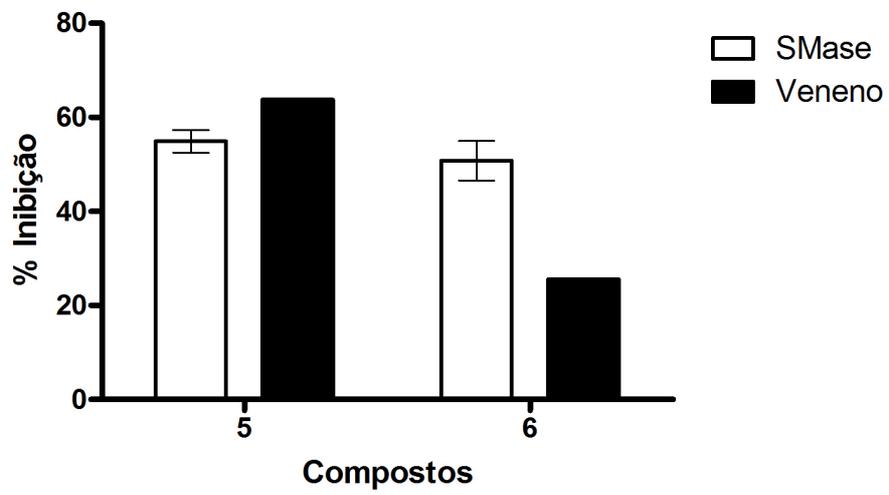


Figura 10

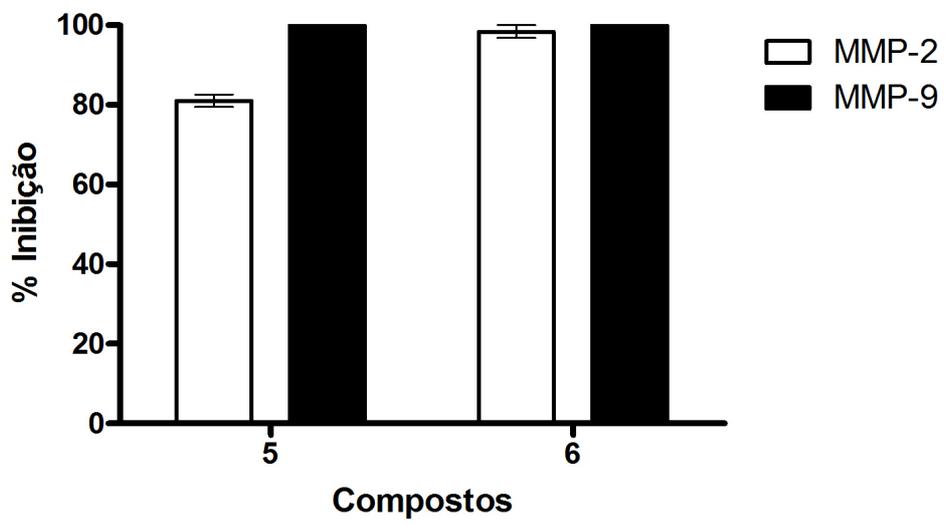


Figura 11

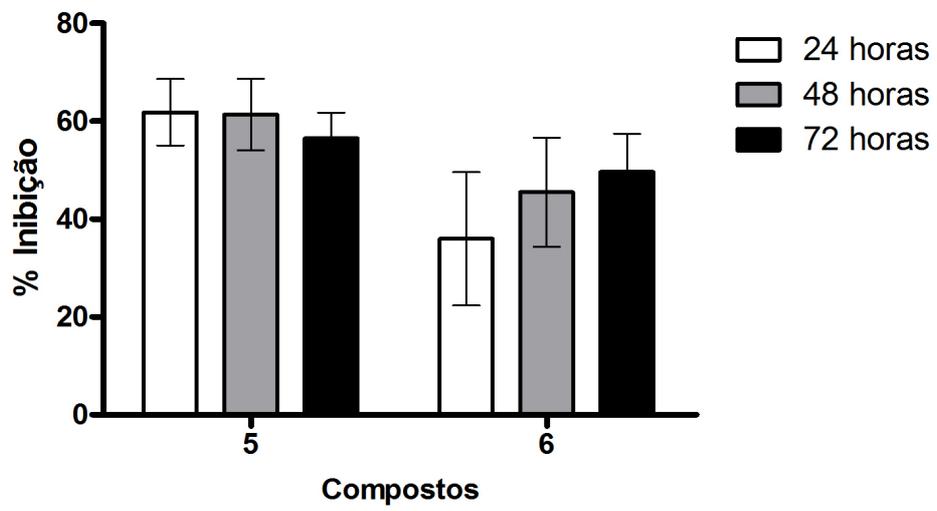


Figura 12

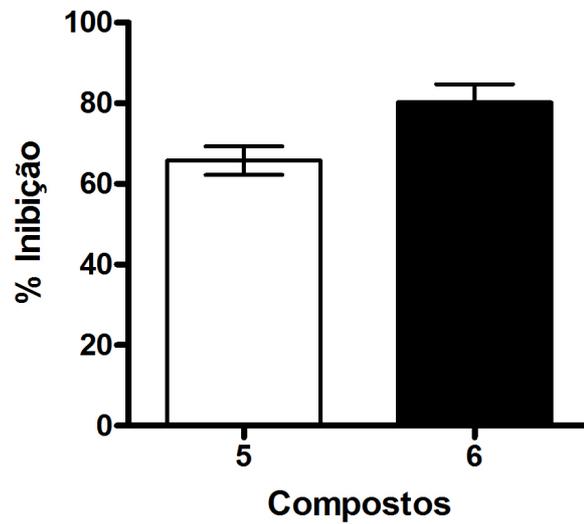


Figura 13

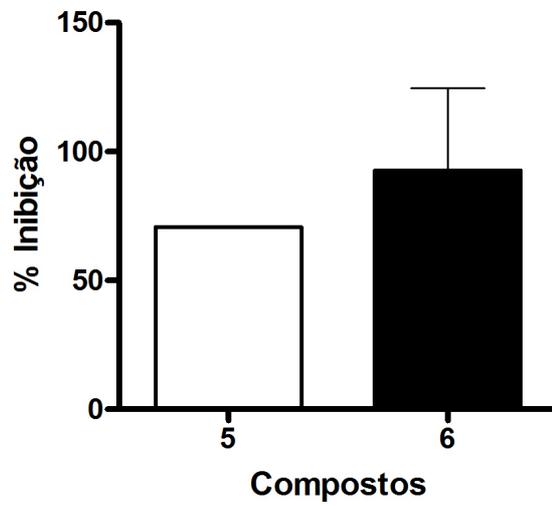


Figura 14

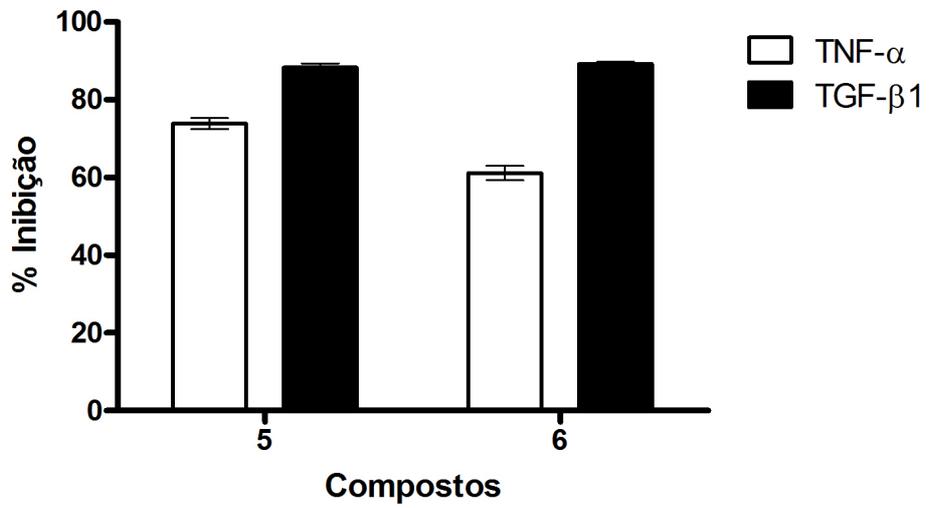


Figura 15

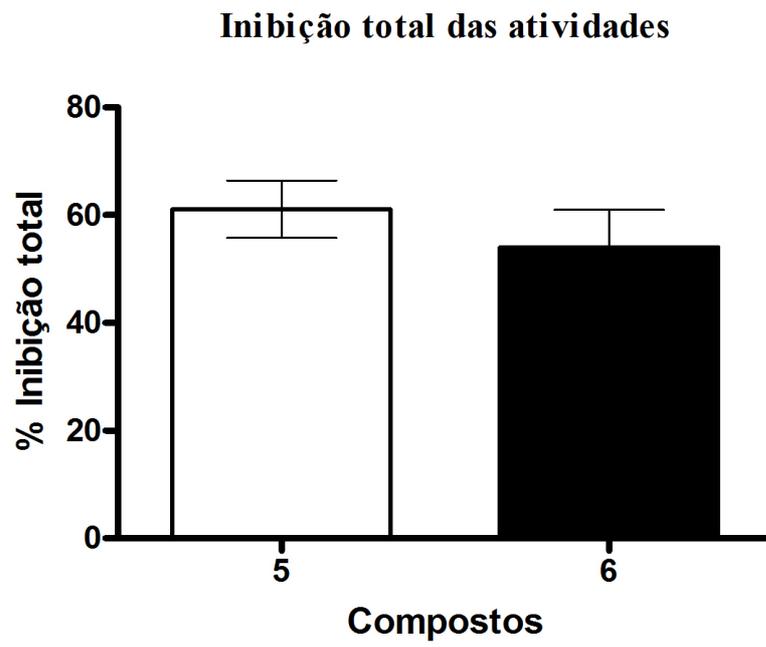


Figura 16