

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade
Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2012/003563 A1

(43) Data de Publicação Internacional
12 de Janeiro de 2012 (12.01.2012)

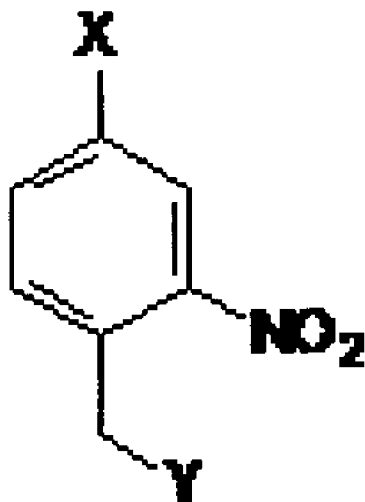
PCT

- (51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 31/192 (2006.01) *A61K 47/40* (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01) *C07C 205/57* (2006.01)
A61K 31/04 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (72) Inventores; e
(75) Inventores/Requerentes (*para US unicamente*) :
BARBOSA DE OLIVEIRA, Renata [BR/BR]; Rua Maria Alves, nº 11, apto 301. Bairro Carmo, CEP: 303 10-070, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
ALVES, Ricardo José [BR/BR]; Rua José Wanderley Lara, 135, apt.101, Bairro Dona Clara, CEP 3 1260-170, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).
FREITAS MARQUES, Maria Betânia [BR/BR]; Rua Passa Quatro, nº 578. Bairro Caiçara, CEP: 30775-040, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
CRISTINA DE OLIVEIRA, Mônica [BR/BR]; Rua José Mendes Carvalho, nº 257, apto 102., Bairro Castelo, CEP:30840-350, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
DUARTE VIANNA SOARES, Cristina [BR/BR]; Rua Maria Macedo, nº 642, apto 101. Nova Suiça, CEP: 30460-600, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
REIS FELÍCIO, Lucas [BR/BR]; Rua Campos, nº 129, bloco C-5, apto 201. Carmo, CEP: 35700-407, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
AMARAL LEITE, Elaine [BR/BR]; Rua Maria de Souza Alvez, nº 379, apto 204. Castelo, CEP: 35700-407, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR20 11/000221
- (22) Data do Depósito Internacional :
7 de Julho de 2011 (07.07.2011)
- (25) Língua de Depósito Internacional : Português
- (26) Língua de Publicação : Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :
0141 10002138 7 de Julho de 2010 (07.07.2010) BR
14100002301 7 de Julho de 2010 (07.07.2010) BR
- (71) Requerente (*para todos os Estados designados, exceto US*) : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG** [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º Andar, sala 2013, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : ANTINEOPLASTIC PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SUBSTITUTED NITROAROMATIC COMPOUNDS

(54) Título : COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTINEOPLÁSTICAS CONTENDO COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS



(57) Abstract : The present invention describes antineoplastic pharmaceutical compositions comprising substituted nitroaromatic compounds. The compositions can be used for treating early-stage neoplasias or in combination with other antitumour drugs for more advanced stages of the disease.

(57) Resumo : A presente invenção descreve composições farmacêuticas antineoplásticas compreendendo compostos nitroaromáticos substituídos. As composições podem ser utilizadas no tratamento de neoplasias em estágio inicial ou em associação com outros fármacos antitumorais em estágios mais avançados da doença.

FIGURA 1

WO 2012/003563 A1

SILVA LOPES, Marcela [BR/BR]; Rua Geraldo Faria Souza, n° 632, apto 701., Sagrada Família, CEP:3 1035-5 10, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
DE SOUZA FAGUNDES, Elaine [BR/BR]; Rua Ézio Mário Terenzi, 102, apto 101. Minaslandia, CEP: 31812-080, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).
FRIZZOLA DE ANDRADE, Camila [BR/BR]; Rua Vulcânia, 11, apto 204, bloco 4. Serrano., CEP: 30882-020, Belo Horizonte - Minas Gerais (BR).

(74) Mandatário : DE CASTRO LEITE GORI, Ana Luiza; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, Sala 2008, CEP:3 1270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).

(81) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,

NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
- *antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))*

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS ANTINEOPLÁSICAS CONTENDO COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve composições farmacêuticas antineoplásicas compreendendo compostos nitroaromáticos substituídos. As composições podem ser utilizadas no tratamento de neoplasias em estágio inicial ou em associação com outros fármacos antitumorais em estágios mais avançados da doença.

ESTADO DA TÉCNICA

Os tumores sólidos, tais como os carcinomas de pulmão, cólon e mama, constituem os principais tipos de câncer do homem. Existem consideráveis evidências de que a existência de células em condições de hipoxia, presentes nos tumores sólidos, possa limitar a eficácia da radioterapia. Estas mesmas células podem, também, ser resistentes a muitos dos agentes quimioterápicos disponíveis no mercado. Entretanto, este aparente obstáculo pode ser explorado para o planejamento de agentes com citotoxicidade seletiva para células em hipoxia (Cerecetto, H., Gonzalez, M., Lavaggi, M. L. Development of Hypoxia Selective Cytotoxins for Câncer Treatment: An Update. Med. Chem. 2, 315, 2006. Papadopoulou, M. V., Bloomer, W. D. Exploiting hypoxia in solid tumors with DNA-targeted bioreductive drugs. Drugs Fut 29, 807, 2004. Wouters, B. G., Wepler, S. A, Koritzinsky, M., Landuyt, W., Nuyts, S., Theys, J., Chiu, R. K., Lambin, P. Hypoxia as a target for combined modality treatments. Eur. J. Câncer. 38, 240, 2002).

Em 1972, Lin e colaboradores levantaram a hipótese de que as regiões de células em hipoxia poderiam apresentar uma maior capacidade de redução do que as regiões de células bem oxigenadas. Por analogia, células em condições de hipoxia nos tumores sólidos poderiam existir em um microambiente que propiciaria a ocorrência de processos redutivos. Concluiu-se, portanto, que estas características das células em hipoxia poderiam ser exploradas no desenvolvimento de agentes quimioterápicos, os quais só se tornariam citotóxicos após ativação metabólica. A partir daí, o conceito de

ativação biorredutiva de substâncias em células em hipoxia tem sido extensivamente estudado (Dai, J., Liu, Y., Zhou, Y., Nagle, D. G. Hypoxia-selective antitumor agents: norsesiterterpene peroxides from the marine sponge *Diacarnus* /ev// preferentially suppress the growth of tumor cells under hypoxic conditions. J. Nat. Prod. 70, 130, 2007. Lalani, A. S., Alters, S. E., Wong, A., Albertella, M. R., Cleland, J. L., Henner, W. D. Selective tumor targeting by the hypoxia-activated prodrug AQ4N blocks tumor growth and metastasis in preclinical models of pancreatic câncer. Clin. Câncer Res. 13, 2216, 2007. Yamazaki, Y., Kunimoto, S., Ikeda, D. Rakicidin A: A Hypoxia-Selective Cytotoxin. Biol. Pharm. Bul. 30, 261, 2007. Anderson, R. F., Shinde, S. S., Hay, M. P., Gamage, S. A., Denny, W. A. Radical properties governing the hypoxia-selective cytotoxicity of antitumor 3-amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxides. Org. Biomol. Chem. 3, 2167, 2005).

A capacidade dos nitroaromáticos de atuarem como agentes biorredutíveis já é bem estabelecida e, portanto, esses compostos podem ser utilizados, como pró-fármacos com seletividade para células em hipoxia (Abreu, F. C.; Ferraz, P. A. L.; Goulart, M. O. F. J. Braz. Chem. Soc. v. 13, p. 19-35, 2002.; Hay, M. P. et al. J. Med. Chem. v. 38, p. 1928-1941, 1995).

O conceito de ativação biorredutiva de substâncias em células em hipoxia tem sido extensivamente estudado (Dai, J. et al. J. Nat. Prod. v. 70, p. 130-133, 2007.; Lalani, A. S. et al. Clin. Câncer Res. v. 13, p. 2216-2225, 2007.; Yamazaki, Y. et al. A Hypoxia-Selective Cytotoxin. Biol. Pharm. Bul. v.30, p. 261-265, 2007.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Lavaggi, M. L. Med. Chem. v. 2, p. 315-327, 2006) e, vale ressaltar que, atualmente, duas substâncias, a tirapazamina e o banoxantrona (AQ4N) estão em fase final de estudos de triagem clínica (Novacea. About AQ4N. Disponível em: http://www.redorbit.com/news/health/1255929/novaceas_proofofprinciple_study_of_aq4n_in_solid_tumors_published_in/index.html Acesso em 28 de março de 2009, Marcu, L.; Olver, I. Curr. Clin. Pharmacol. v. 1, p. 71-79, 2006). A atividade antitumoral para células em hipoxia de mostardas nitrogenadas derivadas da 2,5-dinitrobenzamida também está em investigação, com

resultados promissores (Atwell, G. J. *et al.* J. Med. Chem. v.50, p. 1197-1212, 2007).

O composto ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico é muito utilizado como substrato em sínteses. Zhang et al descreveram a utilização do ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico como precursor chave da benzodiazepina-2-3-diona, por meio de uma sequência de quatro etapas, incluindo deslocamento nucleofílico, acilação, simultânea redução de ciclização e alquilação (Zhang Jinfang; Lou Boliang; Saneii Hossain Application of polymer-bound 4-(bromomethyl)-3-nitrobenzoic acid for synthesis of trisubstituted 1,4-benzodiazepine-2,3-diones. *Molecular Diversity* (2003), 6, 13-17.

Sun et al relataram a síntese em fase sólida de 3,4-hidro-2(1 H)-quinazolinonas e 3,4-diidro-1H-quinazolina-2-tionas a partir de resina Rink, acilação do ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico e aminação com aminas primárias, redução com cloreto de estanho e ciclização (Sun, Q.; Zhou, X.; Kyle, D. J. Solid-phase synthesis of 3,4-dihydro-2(1 H)-quinazolinones and 3,4-dihydro-1H-quinazolin-2-thiones. *Tetrahedron Lett.* (2001), 42(25), 4119-4121).

Adicionalmente, Oliveira et al avaliaram a atividade de nitrocompostos aromáticos contra *Trypanosoma cruzi*, incluindo a atividade tripanocida do ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico (R.B. Oliveira, A.P.F. Passos, R.O. Alves, A.J. Romanha, M.A.F. Prado, J. Dias de Souza Filho and R.J. Alves, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (2003), 98, p. 141).

Atualmente encontramos disponíveis algumas patentes relativas à invenção:

Na patente EP 866709 está descrita uma composição farmacêutica parenteral contendo a tirapazamina para tratamento de câncer, em especial tumores sólidos, utilizada isoladamente ou em combinação com radioterapia ou outros agentes quimioterápicos.

No pedido de patente WO20081 18150 está relatado um método para tratamento, prevenção ou melhora de desordens hiperproliferativas por meio da determinação do nível de óxido nítrico sintase em fluidos corporais, e a posterior administração de substâncias biorredutíveis, incluindo a banoxantrona.

O tratamento de pacientes com câncer utilizando substâncias biorredutíveis com seletividade para células em hipoxia está em investigação, mas essas substâncias ainda não estão disponíveis no mercado. Novas opções de substâncias apresentando seletividade para células tumorais em hipoxia são importantes na tentativa de superar as desvantagens das opções atualmente investigadas, tais como, toxicidade para células normais, propriedades físico-químicas inadequadas, e necessidade de associação com fármacos antitumorais clássicos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

- 10 **Figura 1:** Fórmula estrutural de compostos nitroaromáticos substituídos
Figura 2: Estrutura do ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico (ANB)
Figura 3: Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) do ANB puro
Figura 4: Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) do complexo ANB: β -CD.
- 15 **Figura 5:** Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da mistura física ANB: HP- β -CD
Figura 6: Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da HP- β -CD
Figura 7: Diagrama de solubilidade ABN:HP-p-CD
Figura 8: Gráfico de comparação de crescimento do tumor entre grupo controle e ANB na dose de 50 mg/Kg ($n = 5$) e volume inicial do tumor $\sim 250 \text{ mm}^3$.
- 20 **Figura 9:** Gráfico de comparação de crescimento do tumor entre grupo controle e ANB na dose de 50 mg/Kg ($n = 6$) e volume inicial do tumor $\sim 400 \text{ mm}^3$.
Figura 10: Gráfico de comparação de crescimento do tumor entre grupo controle e complexo ANB: HP- β -CD na dose de 50 mg/Kg ($n = 4$) e volume inicial do tumor $\sim 400 \text{ mm}^3$.
- 25 **Figura 11:** Conjugado AANC-DHA
Figura 12: Esquema de síntese do ENB, pró-fármaco do ANB
Figura 13: Comparação entre os pesos do tumor do Grupo Controle (Grupo 1), Grupo tratado com AANC (Grupo 2) e Grupo tratado com AANC-DHA (Grupo 3).
- 30

Figura 14: Formulás estruturais dos nitrocompostos utilizados para ensaios de atividade frente a linhagens de células tumorais e PBMC.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

A presente invenção descreve composições farmacêuticas antineoplásicas contendo nitroaromáticos substituídos apresentando fórmula estrutural da Figura 1.

Sendo o substituinte "X" da Figura 1 selecionado do grupo compreendendo COOH, SO_3H , tetrazoil, CHO, CH_3 , CH_2OH , CN, COOR, CONHR, SONHR, NHSO_2R , NHCOOR, onde R pode ser H, alquila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação); arila (aromático ou hetero-aromático); alquil-arila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação, aromático ou hetero-aromático).

E o substituinte "Y" da Figura 1 selecionado do grupo compreendendo H, F, Cl, Br, I, OH, N_3 , $\text{OPO}(\text{OR})_2$, NHR, NR_2 , NR_3 , OSO_2R , OSO_2Ar , OAr, OCOR, OCON, SH, SR, SAR; onde R pode ser H, alquila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação); arila (aromático ou hetero-aromático); alquil-arila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação, aromático ou hetero-aromático).

As composições da presente invenção caracterizam-se pelo uso de nitroaromático substituído combinado com excipientes farmacêuticamente aceitáveis. As composições padrões podem ser líquidas, sólidas ou semi-sólidas. Sendo que as preparações líquidas podem se apresentar na forma de solução, suspensão, emulsão, parenteral ou oral. As semi-sólidas na forma de géis, pomadas, cremes ou pastas e as sólidas na forma de cápsulas, comprimidos, drágeas ou pastilhas.

Exemplos de excipientes incluem metilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico, polietilenoglicóis, vaselina sólida, parafina sólida, lanolina, óleos vegetais, óleo mineral, álcool cetílico, álcool esterílico, álcool cetosteárico, monoestearato de glicerila, cera de ésteres cetílicos, cera autoemulsificante não iônica e aniônica e laurilsulfato de sódio, para formas farmacêuticas semi-sólidas.

Aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, tensoativos, como celulose, lactose, amido, manitol, estearato de magnésio, talco, dióxido de silício coloidal, óxido de magnésio e caulim, para preparações sólidas.

Para formas farmacêuticas líquidas podem ser utilizados solubilizantes e tensoativos, tais como glicerina, propilenoglicol e sacarose. Para preparações 5 injetáveis pode ser utilizada água para injetáveis. Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos como substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química como conservantes, quelantes e estabilizantes, exemplos dessas substâncias incluem tampão 10 fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, timerosal, *m*- ou *o*-cresol, formalina, álcool benzílico, parabenos, EDTA, BHA, BHT; além de edulcorantes, corantes e aromatizantes.

Essas composições podem ser administradas via intramuscular, intravenosa, tópica, oral, inalatória ou como dispositivos que possam ser 15 implantados ou injetados. As composições podem ser utilizadas no tratamento de neoplasias em estágio inicial ou em associação com fármacos com atividade antitumoral já estabelecida em estágios mais avançados da doença.

A presente invenção pode ser mais bem entendida por meio dos seguintes exemplos, não limitantes da tecnologia:

20 **Exemplo 1:** Preparação e caracterização dos complexos de inclusão ANB:HP- β -CD

A) Preparação dos complexos de inclusão

O complexo de inclusão ANB:HP- β -CD foi preparado misturando-se HP- β -CD e ANB (Figura 2) em água e acetona, na razão molar 1:1. A mistura foi 25 mantida sob agitação durante 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a acetona foi evaporada e a mistura resultante foi liofilizada. O pó liofilizado foi mantido em dessecador sob vácuo.

B) Caracterização dos complexos de inclusão por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O complexo de inclusão HP- β -CD:ANB 1:1, a mistura física e as substâncias puras foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Na curva DSC do ANB puro (Figura 3) observa-se um evento endotérmico em 134,6°C correspondente ao pico de fusão do ANB e o evento exotérmico em 183,07°C corresponde ao seu produto de degradação, o que indica que a substância é instável a temperaturas maiores que 150°C (temperatura em que substância inicia o processo de degradação). As curvas DSC do complexo (Figura 4) e da mistura física (Figura 5) foram muito semelhantes. Na Figura 6 pode-se observar a curva de DSC da HP- β -CD. Além do evento endotérmico em ~ 42°C, referente a perda de água, observa-se apenas eventos exotérmicos acima de 180° C, correspondente a formação de produtos de degradação. A intensidade desses picos é menor na curva DSC do complexo (Figura 4), o que pode indicar uma maior proteção da substância dentro da cavidade da CD.

C) Medida da isoterma de solubilidade

A concentração de ANB solúvel a diferentes concentrações de HP- β -CD está ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração de ANB solúvel a diferentes concentrações de HP- β -CD

[HP- β -CD] mol/L	[ANB] mol/L	[ANB]solúvel mol/L
0,0	0,02	0,00069
0,004	0,02	0,00096
0,008	0,02	0,00127
0,010	0,02	0,00136
0,015	0,02	0,00171
0,02	0,02	0,00192
0,04	0,02	0,00242
0,06	0,02	0,00250
0,08	0,02	0,00238
0,01	0,02	0,00246

O complexo de inclusão ANB:HP- β -CD apresentou diagrama de solubilidade do tipo A, ou seja, quando a solubilidade do substrato aumenta com o incremento da concentração de CD (Figura 7). Observa-se um aumento linear da concentração de ANB solúvel com o aumento da concentração de HP- β -CD. Esse tipo de diagrama é característico da formação de complexo de inclusão solúvel.

Exemplo 2: Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do ANB e seu complexo de inclusão

A) Indução de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos

Para indução do tumor ascítico foram utilizados três camundongos Swiss fêmeas com peso entre 25 e 30 gramas, para cada experimento. Células de Ehrlich que estavam conservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho de água na temperatura de 37°C. As mesmas foram transferidas para um tubo tipo Falcon, previamente limpo, e a este foi adicionado de maneira lenta e gradual, solução salina 0,9% até que o volume total da suspensão de células fosse de aproximadamente 20 ml. A suspensão foi imediatamente submetida à centrifugação durante 5 minutos, na temperatura de 5°C e velocidade de 3000 RPM. O meio no qual as células estavam conservadas foi retirado como sobrenadante. Foi feita a ressuspensão das células com auxílio de uma pipeta de Pasteur em cerca de 1,5 ml de solução salina 0,9% e em seguida a concentração de células na suspensão foi determinada utilizando-se a câmara de Neubauer. A suspensão foi diluída adequadamente e foram injetados, via intraperitoneal, 1×10^6 células em cada camundongo, em um volume total de 0,5ml.

B) Indução de tumor sólido de Ehrlich em camundongos

Inicialmente, 2×10^6 células tumorais de Ehrlich foram retiradas de camundongos com tumor ascítico e implantadas em camundongos Swiss fêmeas, apresentando um peso entre 20 e 25 gramas, por via subcutânea, dorso-lateralmente. Após 10 dias, os tumores foram medidos e as amostras a serem testadas foram administradas via intratumoral.

C) Avaliação da atividade antitumoral em camundongos

O ANB foi administrado em um grupo de 11 animais na dose de 50 mg/kg, solubilizado em solução salina contendo PEG 400 (polietilenoglicol) (40%), sendo 5 em tumores com volumes de 250 e 6 com volume de 400 mm³. O mesmo número de animais foi utilizado no grupo controle. O complexo ANB:HP-p-CD na dose de 50 mg/kg foi administrado em 4 animais, sendo utilizado o mesmo número de animais como controle.

As doses foram administradas por via intratumoral, 2 vezes por semana, durante 3 semanas. Os volumes dos tumores (mm³) foram calculados a partir das medidas de seu tamanho (T) e largura (L). O volume do tumor foi, então, determinado utilizando a fórmula $T \times (L)^2 / 2$ (Viale, M., Vannozzi, M. O., Merlo, F., Cafaggi, S., Parodi, B., Esposito, M. Cisplatin Combined with the New Cisplatin-Procaïne Complex DPR: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. Eur. J. Câncer 32A, 2327, 1996). Os animais tiveram acesso livre à água e ração e foram mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz.

O ANB puro demonstrou atividade antitumoral quando comparado ao grupo controle, conforme pode ser visualizado nos gráficos das figuras 8 e 9. Observou-se ainda o desaparecimento do tumor sólido em um animal tratado com ANB. O animais tratados com ANB:HP-3-CD apresentaram redução significativa do volume do tumor (Figura 10).

Exemplo 3: Preparo de complexos de inclusão em ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas sólidas contendo ANB

Visando aumentar a estabilidade e a solubilidade em água de forma a facilitar a administração *in vivo* e melhorar a biodisponibilidade, foram preparados complexos de inclusão em ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo o ANB. Por se tratar de um ácido carboxílico, o ANB ioniza do pH utilizado na preparação das NLS, o que dificultou sua incorporação na fase oleosa da formulação. Para contornar esse problema, foi preparado o 4-bromometil-3-nitrobenzoato de metila (ENB), o éster metílico do ANB (Figura 12), o qual é facilmente incorporado na fase oleosa e pode ser

considerado como um pró-fármaco, ou seja, irá liberar o ANB após hidrólise do éster *in vivo*.

As NLS serão preparadas pela técnica de homogeneização a quente. Neste método, a nitroaromático a ser incorporado (ENB) será disperso na fase oleosa fundida. As fases oleosa (FO) e aquosa (FA) serão previamente pesadas e aquecidas separadamente até a temperatura de 75 °C. A FA será vertida lentamente sobre a FO, utilizando homogeneizador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Alemanha), mantendo-se uma agitação de 11000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, as NLS serão submetidas à ultra-sonicação, com uma potência de 21% de amplitude (Ultra-cell, 750 W; Sonics Materials Inc., USA) por 5 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, o pH da formulação será ajustado com solução de HCl 0,1 M a fim de obter o pH final entre 7-7,5. As NLS serão acondicionadas em frasco-âmbar e mantidas na geladeira.

Exemplo 4: Síntese e caracterização de derivados de ANB

Na busca de novas substâncias bioativas, apresentando maior potência e melhores propriedades físico-químicas, realizou-se a síntese de novos derivados do ANB. A melhoria da biodisponibilidade de uma substância pode resultar em uma diminuição da dose efetiva e, conseqüentemente, diminuição dos possíveis efeitos tóxicos. Inicialmente, avaliou-se *in vitro* a atividade dos novos nitrocompostos sintetizados, utilizando-se 3 linhagens de células tumorais humanas: HL60 (leucemia), Jurkat (linfoma) e MCF-7 (tumor de mama). A toxicidade das substâncias para as células normais também foi avaliada, utilizando-se células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

As células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) serão separadas conforme o método descrito por Souza-Fagundes e colaboradores (Souza-Fagundes *et al*, Intern. Immunopharmacol. 3, 383-392, 2003). A análise do fenótipo das populações de leucócitos do sangue periférico (linfócitos-T, B, monócitos e células-NK, granulócitos), tratadas ou não com os nitrocompostos, foram realizadas por meio do estudo de marcadores de superfície celular, após marcação com anticorpos monoclonais conjugados à ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC). Quinhentos microlitos do sangue periférico foi diluído com RPMI e cultivado em tubos de polipropileno

na presença ou não de diferentes concentrações das amostras por 14 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, as amostras foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos utilizando-se 2 ml de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos à 18°C. O sobrenadante foi desprezado e as células homogeneizadas em 400 µL de PBS 0,015 M contendo 0,01 % de azida de sódio. Esta suspensão foi dividida nos diferentes tubos contendo os anticorpos já diluídos (100µI por tubo) e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação, essas células foram lavadas com PBS 0,015 M contendo 0,01% de azida de sódio, ressuspensas em 300 µI de uma solução contendo paraformaldeído, 1%, cacodilato de sódio 1% e NaCl 0,67%, em PBS, sendo fixadas por, no mínimo, 30 minutos e mantidas a 4° C até a análise por citometria de fluxo. Os dados foram adquiridos usando um citometro de fluxo FACscan (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, US) e a identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares foram realizadas utilizando-se o programa Cell-Quest. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 2.

20 Tabela 2 - Resultados dos ensaios de atividade frente a linhagens de células tumorais e PBMC utilizando os compostos derivados (figura 14)

Composto	R1	R2	R3	IC50 (uM)			
				HL60	Jurkat	MCF-7	PBMC
ABB	OH	H	Br	36,30	>100	23,63	88,75
ANB	OH	NO ₂	Br	72,71	68,95	44,09	>100
ANBEM	OCH3	NO ₂	Br	90,13	> 80	-	44,06
ANOH	OH	NO ₂	OH	>100	>100	-	> 100
EANB	NH(CH ₂) ₂ OH	NO ₂	Br	14,92	53,28	30,54	53,87
AANC	NH(CH ₂) ₂ OH	NO ₂	Cl	9,09	19,36	79,89	>100
AAMs	NH(CH ₂) ₂ Cl	NO ₂	Cl	49,23	85	63	>100
AANEB	NH(CH ₂) ₂ O ₂ C(CH ₂) ₂ CH ₃	NO ₂	Cl	15,96	>100	29,54	-
ASNCI	NH(CH ₂) ₂ OH	H	Cl	>100	>100	>100	>100
DIAANC	-	-	-	19,36	30,20	22,92	-
etoposídeo	-	-	-	8,419	2,471	> 100	> 100

Até o momento, foram sintetizadas e testadas 12 substâncias das quais 7 apresentaram atividade citotóxica significativa, sendo mais ativas do que o etoposídeo (controle positivo) contra a linhagem de células de tumor de mama (MCF-7). A síntese de uma nova série de moléculas está em andamento.

5 A 4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-hidroxiethyl)benzamida (AANC) apresentou atividade significativa contra as 3 linhagens de células tumorais, sendo mais ativa contra as linhagens HL60 e Jurkat. Além disso, a AANC apresentou baixa toxicidade para as células normais (PBMC), o que a torna um protótipo promissor para estudos adicionais *in vivo*. Além disso, a presença do grupo hidroxila na
10 AANC favorece a sua conjugação com o ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexanóico (DHA) por meio de uma reação de esterificação (Figura 11). Alguns ácidos graxos naturais, tais como o DHA, são avidamente consumidos pelas células tumorais para utilização como precursores bioquímicos ou fonte de energia. Além disso, certos ácidos graxos essenciais também apresentam
15 sinergismo com fármacos antitumorais. Portanto, a conjugação de fármacos antitumorais com o DHA é uma estratégia promissora que vem sendo estudada com resultados animadores (Wang et al., *Bioorg. Med. Chem.* v. 14, p. 7854-7861, 2006; Wang et al., *Bioorg. Med. Chem.* v. 13, p. 5592-5599, 2005; Harries et al., *Brit. J. Câncer* v. 91, p. 1651-1655, 2004).

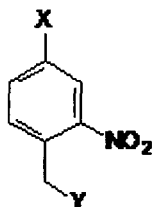
20 **Exemplo 5:** Avaliação da atividade antitumoral da AANC e de seu conjugado com DHA *in vivo*

A atividade antitumoral da AANC e de seu conjugado com DHA foi avaliada *in vivo*, utilizando-se camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich. O AANC e AANC-DHA foram administrados em um grupo de 5 animais
25 na dose de 30 mg/kg. Ambos foram solubilizados em solução salina contendo 35% de PEG 400 e 5% de Tween 80. O mesmo número de animais foi utilizado no grupo controle. As doses foram administradas por via intratumoral, 2 vezes por semana, durante 14 dias. Quarenta e oito horas após o final do tratamento os animais foram eutanasiados, os tumores foram dessecados e pesados. A
30 porcentagem de inibição do crescimento do tumor foi calculada utilizando a fórmula %inibição = [(A - B)/A] x 100, onde A representa a média de peso do tumor do grupo controle e B representa a média do peso do tumor nos grupos

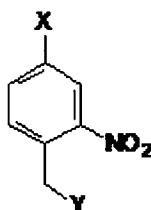
tratados. Com base nessa fórmula, o nitrocomposto AANC e seu conjugado com DHA apresentaram atividade antitumoral significativa, com % de inibição do crescimento do tumor de 62% e 44%, respectivamente (Figura 13). Esses compostos também podem ser administrados utilizando outras vias, como a via
5 endovenosa e a via oral, não limitante.

REIVINDICAÇÕES

1- **NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS** caracterizado por apresentar a seguinte fórmula estrutural:



- 5 a) Sendo X selecionado do grupo compreendendo COOH, SO₃H, tetrazoil, CHO, CH₃, CH₂OH, CN, COOR, CONHR, SONHR, NHSO₂R, NHCOOR, onde R pode ser H, alquila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação); arila (aromático ou hetero-aromático); alquil-arila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação, aromático ou hetero-aromático);
- 10 b) Sendo Y selecionado do grupo compreendendo H, F, Cl, Br, I, OH, N₃, OPO(OR)₂, NHR, NR₂, NR₃, OSO₂R, OSO₂Ar, OAr, OCOR, OCON, onde R pode ser H, alquila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação); arila (aromático ou hetero-aromático); alquil-arila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação, aromático ou hetero-aromático).
- 15 2- **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTINEOPLÁSICA**, caracterizada por compreender nitroaromáticos substituídos apresentando a seguinte fórmula estrutural:



- sendo X selecionado do grupo compreendendo COOH, SO₃H, tetrazoil, CHO, CH₃, CH₂OH, CN, COOR, CONHR, SONHR, NHSO₂R, NHCOOR, onde R pode ser H, alquila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação); arila (aromático ou hetero-aromático); alquil-arila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação, aromático ou hetero-aromático);
- 20

- sendo Y selecionado do grupo compreendendo H, F, Cl, Br, I, OH, N₃, OPO(OR)₂, NHR, NR₂, NR₃, OSO₂R, OSO₂Ar, OAr, OCOR, OCON, onde R pode ser H, alquila(C-2 a C-30, com ou sem ramificação); arila(aromático ou heteroaromático); alquil-arila (C-2 a C-30, com ou sem ramificação, aromático ou heteroaromático); e

- no mínimo um excipiente ou adjuvante farmacêutica e fisiologicamente aceitável.

3- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTINEOPLÁSICA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelos compostos nitroaromáticos substituídos serem utilizados na sua forma livre, incluído ou associado em ciclodextrinas.

4- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTINEOPLÁSICA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelas ciclodextrinas serem selecionadas do grupo compreendendo α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina e seus derivados.

5- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTINEOPLÁSICA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pela ciclodextrina ser preferencialmente a hidroxipropil- β -ciclodextrina.

6- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTINEOPLÁSICA, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo compostos nitroaromáticos substituídos serem utilizados individualmente ou em combinação com outros agentes antineoplásicos.

7- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTINEOPLÁSICA, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizada por ser administrada pelas vias oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

8- USO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS, caracterizado por ser na preparação de medicamentos antitumorais.

FIGURAS

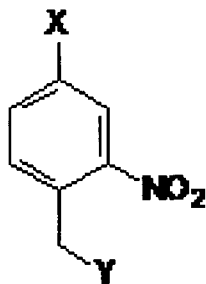


FIGURA 1

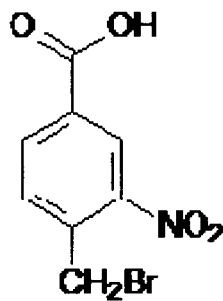


FIGURA 2

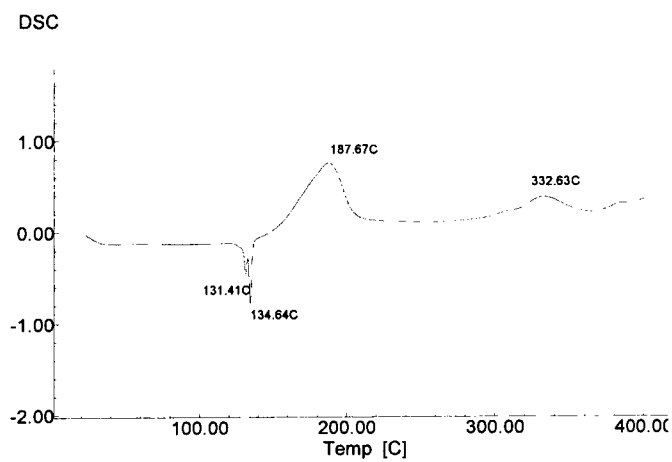


FIGURA 3

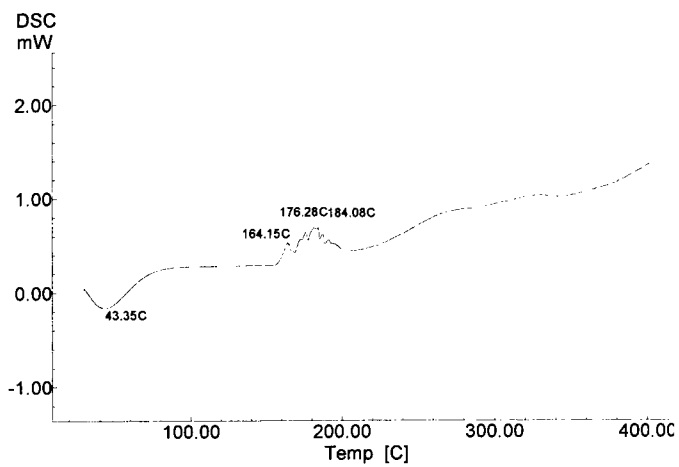


FIGURA 4

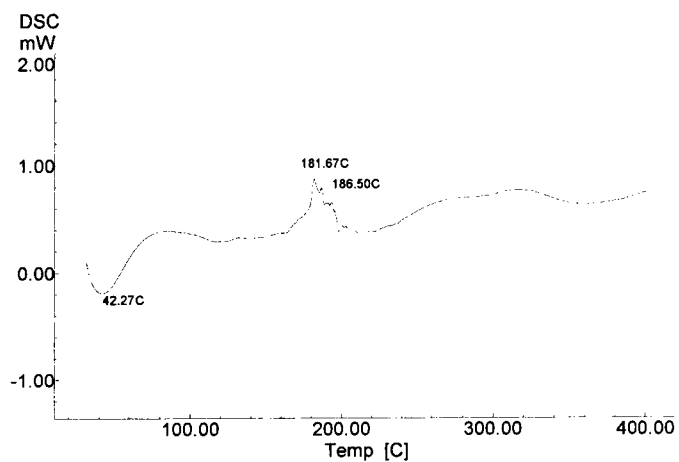


FIGURA 5

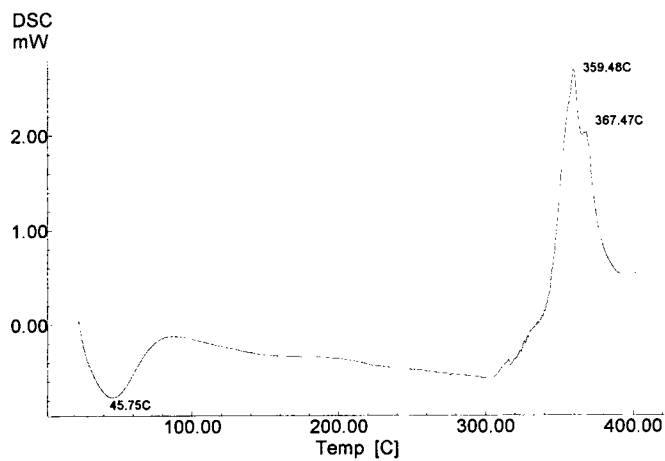


FIGURA 6

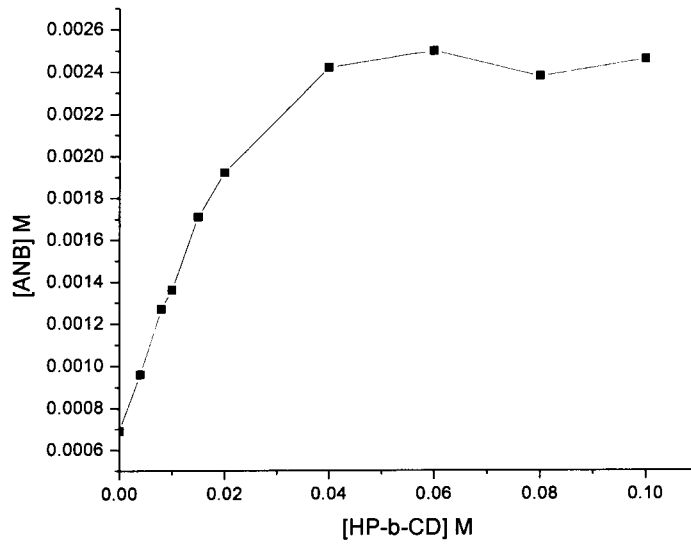


FIGURA 7

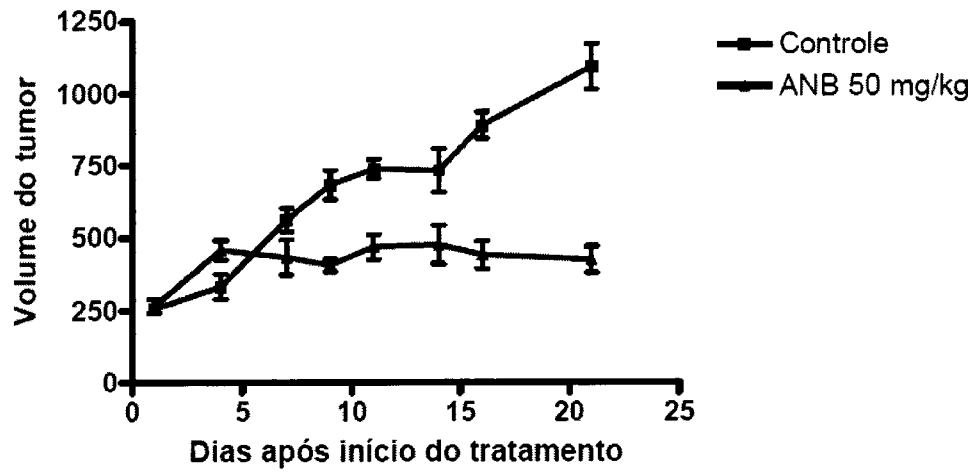


FIGURA 8

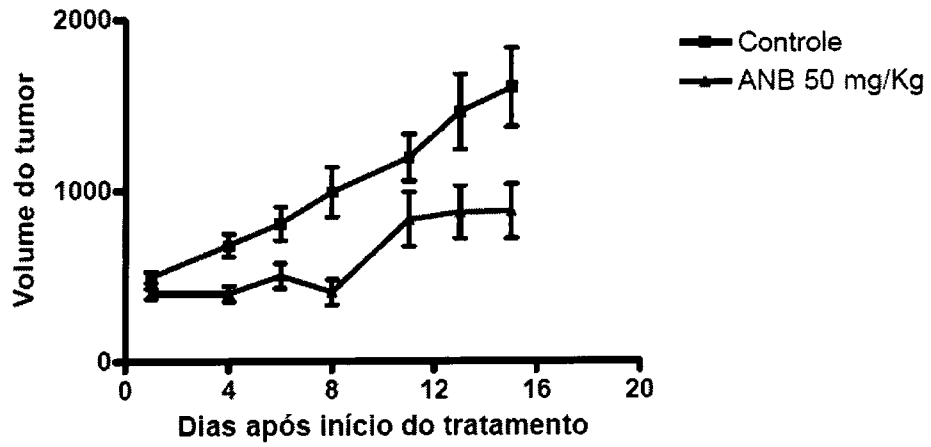


FIGURA 9

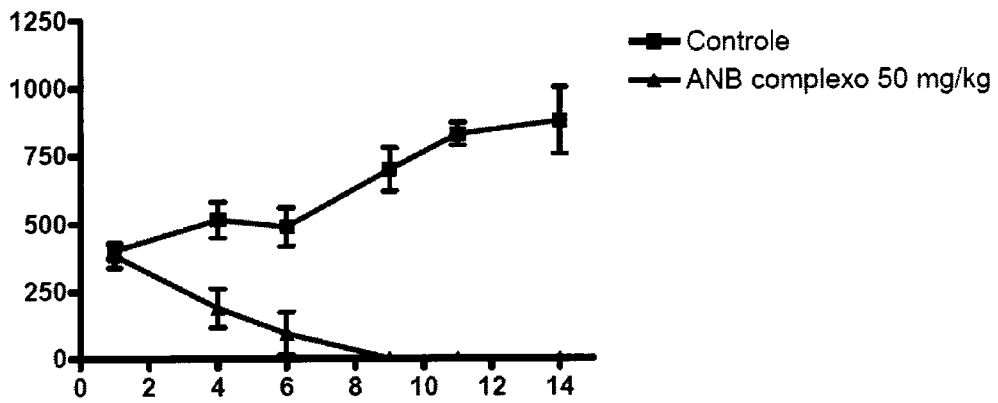


FIGURA 10

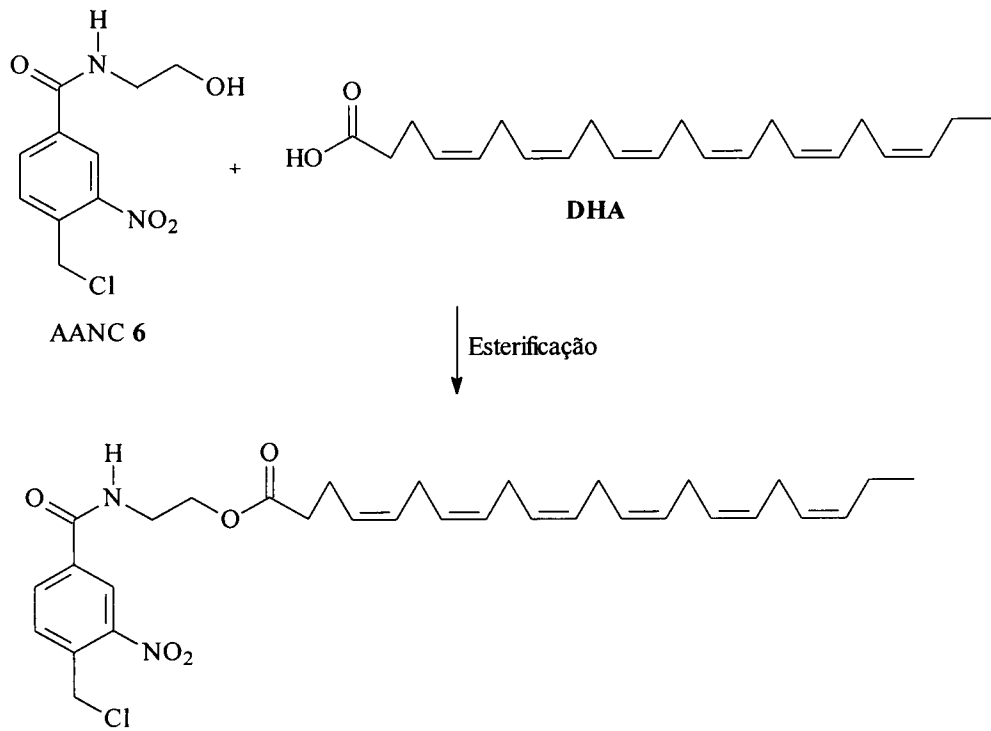


FIGURA 11

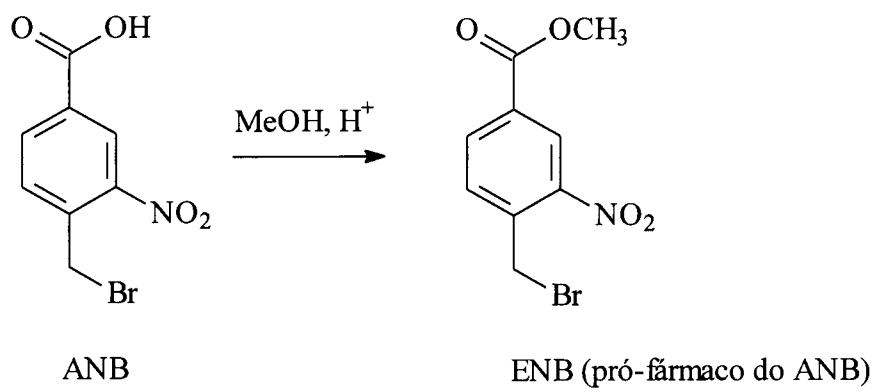


FIGURA 12

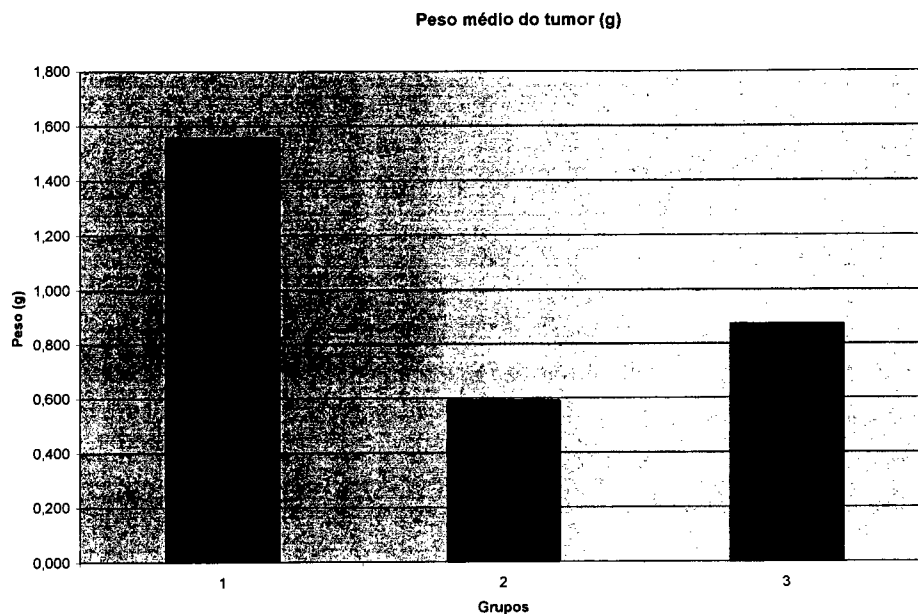
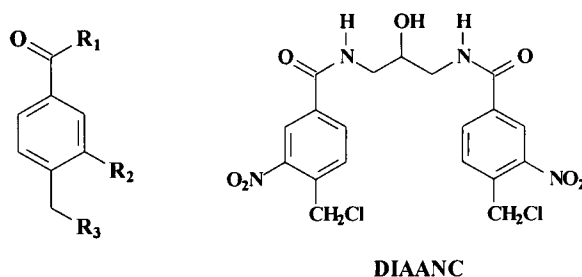


FIGURA 13



Composto	R1	R2	R3
ABB	OH	H	Br
ANB	OH	NO ₂	Br
ANBEM	OCH ₃	NO ₂	Br
ANOH	OH	NO ₂	OH
EANB	NH(CH ₂) ₂ OH	NO ₂	Br
AANC	NH(CH ₂) ₂ OH	NO ₂	Cl
AAMs	NH(CH ₂) ₂ Cl	NO ₂	Cl
AANEB	NH(CH ₂) ₂ O ₂ C(CH ₂) ₂ CH ₃	NO ₂	Cl
ASNCI	NH(CH ₂) ₂ OH	H	Cl
DIAANC	-	-	-
etoposídeo	-	-	-

FIGURA 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/192 (2006.01), A61K 31/166 (2006.01), A61K31/04 (2006.01), A61K47M0 (2006.01), C07C 205/57 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01) According to international Patent (Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched INPI/Br		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Epodoc, WPI, Medline, Spacenet, Chemsearch, Chemical Abstracta		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5464871 A (OCTAMERINC [US]) 07 November 1995 (1995-11-07) (the whole document)	1,2, 6 a 8
X	Hone, N.D.; Wilson, W.; Reader, J.C. Solid phase synthesis of tetrahydro-1,4-benzodiazepin-2-ones. Tetrahedron Letters, 44, 8493-8495, 2003, (page 1, exemple 1)	1
X	Chen, M.; Diao, G.; Zhang, E. Study of inclusion complex of b-cyclo-dextrin and nitfobenzene. Chemosphere, 63, 522-529, 2006. (the whole document)	3 a 5
A	Prósser, G.Á.; Copp, J.N.; Syddall, S.R; et al. Discovery and evaluation of Escherichia coli nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. Biochemical Pharmacology, 79, 678-687, 21 October 2009	---
<input type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 03 November 2011	Date of mailing of the international search report 11/112011	
Name and mailing address ^{3/4} the ISA/ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Marink Veiga n° 9, 18. andar cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ +55 21 3037-3663	Authorized officer Thiago Silva Torres	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR2011/000221

US.5464871 A	1995-11-07	AT 169296 T	1998-08-15
		AU 676992 B2	1997-04-10
		AU 68188.9 B2	1997-09-11
		AU 1260992 A	1993-05-21
		AU 4897596 A	1996-08-14
		AU 5298693 A	1994-05-24
		AU 6914494 A	1994-12-12
		CA 2121900 A1	1993-04-29
		CA 2148455 A.1	1994-05-11
		CA 2162556 A1	1994-11-24
		DE 69412251 D1	1998-09-10
		EP 0609211 A1	1994-08-10
		EP 0666742 A1	1995-08-16
		3/4 P 0698019 A1	1996-02-28
		IL 107249 DO	1994-01-25
		IL 116841 DO	1996-05-14
		JP 7502975 T	1995-03-30
		JP 3070767 B2	2000-07-31
		JP 8510452 T	1996-11-05
		JP 10504517 T	1998-05-06
		US 5473074 A	1995-12-05
		US 5482975 A	1996-01-09
		US 5516941 A	1996-05-14
		US 5652260 A	1997-07-29
		US 5652367 A	1997-07-29
		US 56705 18 A	1997-09-23
		US 5753674 A	1998-05-19
		US 5877185 A	1999-03-02
		US 6004978 A	1999-12-21
		WO 9307868 A1	1993-04-29
		WO 9409776 A1	1994-05-11
		WO 9426730 A2	1994-11-24
		WO 9622791 A1	1996-08-01
		ZA 9600519 A	1996-08-15

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional N°

PCT/BR2011/000221

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A61K 31/192 (2006.01), A61K 31/166 (2006.01), A61K31/04 (2006.01), A61K47/40 (2006.01), C07C 205/57 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C07D, A61K, A61P

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentas estão incluídos nos domínios pesquisados

Banco de Patentes INPI/Br

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

Epodoc, WPI, Medline, Spacenet, Chemsearch, Chemical Abstracta \

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	US 5464871 A (OCTAMER INC [US]) 07 novembro 1995 (1995-11-07) (documento inteiro)	1,2, 6 a 8
X	Höne, N.D.; Wilson, W.; Reader, J.C. Solid phase synthesis of tetrahydro-1,4-benzodiazepn>2-ortes. Tetrahedron Letters, / 44, 8493-8495, 2003. (página 1, esquema 1)	1
X	Chen, M.; Diao, G.; Zhang, E. Study of inclusion complex of b-cyclo-dextrin and nitrobenzené. Ghemosphere,, 63, 522-529, 2006. (documento inteiro)	3 a 5
A	Prósser, G.Â.; Copp, J.N.; Syddall, S.P.; et al. Discovery and eraluation of Escherichia çoli nitroreductases that activate the anti-! câncer prodrug CB1954. Biochemical Pharmacolpgy, 79, 678-687, 21 de outubro de 2009.	---

Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C

Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que detne o estadb geral da técnica, mas nio é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na, data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(i) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinara data de outra citação ou por outra razão especial;

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data deprioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não condita como depósito, poremeitado para entender o principio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver urmatividade inventiva quando o documento i considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado comum outro documento ou mais dcum tal combinação sendo óbvia para umtécnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

03 de noverpbro de 2011

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

111111

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INQUSTRIAL
Rua Mayrlnk Veiga n° 9, 18. andar
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 3037-3663

N° de fax:

Funcionário autorizado

Thlago Silva Torres

N° de telefonei

+55 21 3037-3493/3742

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº ,

PCT/BR2011/000221

Documentos de patente citados no Relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US-5464871 A	1995-11-07	AT 169296 T-	1998-08-15
		AU 676992 B2	1997-04-10
		AU 68188.9 B2	1997-09-11
		AU 1260992 A	1993-05-21
		AU 4897596 A	1996-08-14
		AU 5298693 A	1994-05-24
		AU 69 14494 A	1994-12-12
		CA 2121900 A1	1993-04-29
		CA 2148455 A.1	1994-05-11
		CA 2162556 A1	1994-11-24
		DE 69412251 D1	1998-09-10
		EP 0609211 A1	1994-08-10
		EP 0666742 A1	1995-08-16
		EP 0698019 A1	1996-02-28
		IL 107249 DO	1994-01-25
		IL 116841 DO	1996-05-14
		JP 7502975 T	1995-03-30
		JP 3070767 B2	2000-07-31
		JP 8510452 T	1996-11-05
		JP 10504517 T	1998-05-06
		US 5473074 A	1995-12-05
		US 5482975 A	1996-01-09
		US 5516941 A	1996-05-14
		US 5652260 A	1997-07-29
		US 5652367 A	1997-07-29
		US 5670518 A	1997-09-23
		US 5753674 A	1998-05-19
		US 5877185 A	1999-03-02
		US 6004978 A	1999-12-21
		WO 9307868 A1	1993-04-29
		WO 9409776 A1	1994-05-11
		WO 9426730 A2	1994-11-24
		WO 9622791 A1	1996-08-01
ZA9600519A	1996-08-15		