



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

(11) BR 112013011480-0 B1



(22) Data do Depósito: 11/11/2011

(45) Data de Concessão: 22/03/2022

(54) Título: USO DE PM01183 OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO E KIT PARA USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: A61K 31/4995; A61K 31/69; A61K 45/06; A61K 38/15; A61P 35/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 12/11/2010 EP 10382300.1.

(73) Titular(es): PHARMA MAR, S.A..

(72) Inventor(es): VICTORIA MONEO OCAÑA; GEMA SANTAMARÍA NÚÑES; LUIS FRANCISCO GARCÍA FERNÁNDEZ; CARLOS MARÍA GALMARINI; MARÍA JOSÉ GUILLÉN NAVARRO; PABLO MANUEL AVILÉS MARÍN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2011069976 de 11/11/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/062920 de 18/05/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/05/2013

(57) Resumo: MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODO DE AUMENTO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE UMA DROGA ANTICÂNCER, PM01183 OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO, USO DO MESMO KIT PARA O USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER. A presente invenção refere-se à combinação de PM01183 com várias drogas anticâncer, em particular outras drogas anticâncer selecionada dentre complexos de coordenação de platina antitumorais, antimetabólitos, inibidores mitóticos, antibióticos anticâncer, inibidores de topoisomerase I e/ou II, inibidores de proteassoma, inibidores de histona deacetilase, agentes de alquilação de mostarda de nitrogênio, agentes de alquilação de nitrosureia, agentes alquilantes não clássicos, antagonista de estrogênio, antagonista de andrógeno, inibidores de mTOR, inibidores de tirosina quinase e outros agentes selecionados dentre apilidina ET-743, PM02734 e PM00104, e o uso dessas combinações no tratamento de câncer.

USO DE PM01183 OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO E KIT PARA USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à combinação de PM01183 com outras
5 drogas anticâncer, em particular outras drogas anticâncer selecionadas dentre
complexos de coordenação de platina antitumorais, antimetabólitos, inibidores
mitóticos, antibióticos anticâncer, inibidores de topoisomerase I e/ou II, inibidores
de proteassoma, inibidores de histona deacetilase, agentes de alquilação de
10 mostarda de nitrogênio, agentes de alquilação de nitrosureia, agentes alquilantes
não clássicos, antagonistas de estrogênio, antagonistas de andrógeno, inibidores
de mTOR, inibidores de tirosina quinase, e outros agentes selecionados dentre
aplidina, ET-743, PM02734, e PM00104 e o uso dessas combinações no
tratamento de câncer.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 O câncer desenvolve-se quando células em uma parte do corpo começam a
crescer descontroladamente. Embora haja muitos tipos de câncer, todos surgem
do crescimento descontrolado de células anormais. Células cancerígenas podem
invadir tecidos próximos e podem se espalhar através da corrente sanguínea e do
sistema linfático para outras partes do corpo. Há vários tipos principais de câncer.
20 O carcinoma é um neoplasma maligno, que é um crescimento progressivo e
descontrolado, surgindo de células epiteliais. Células epiteliais cobrem superfícies
internas e externas do corpo, incluindo órgãos, revestimento dos vasos e outras
cavidades pequenas. O sarcoma é o câncer surgindo de células no osso,
cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou outro tecido conjuntivo ou de
25 sustentação. A leucemia é o câncer que surge no tecido de formação do sangue,
tal como a medula óssea, e faz com que grandes números de células sanguíneas
anormais sejam produzidos e entrem na corrente sanguínea. O linfoma e o mieloma
múltiplo são cânceres que surgem a partir de células do sistema imunológica.

Adicionalmente, o câncer é invasivo e tende a se infiltrar nos tecidos
30 circundantes e dão origem a metástases. Pode se espalhar diretamente para dentro
dos tecidos circundantes e podem também se espalhar através dos sistemas
circulatório e linfático para outras partes do corpo.

Muitos tratamentos estão disponíveis para o câncer, incluindo cirurgia e radiação para doença localizada, e quimioterapia. No entanto, a eficácia de tratamentos disponíveis para muitos tipos de câncer é limitada, e novas formas melhoradas de tratamento mostrando benefícios clínicos são necessários. Isso é especialmente verdadeiro para aqueles pacientes apresentando doença avançada e/ou metastática e para pacientes recaindo com doença progressiva após ter sido previamente tratado com terapias estabelecidas que se tornaram ineficazes ou intoleráveis devido à aquisição de resistência ou limitações na administração das terapias devido às toxicidades associadas.

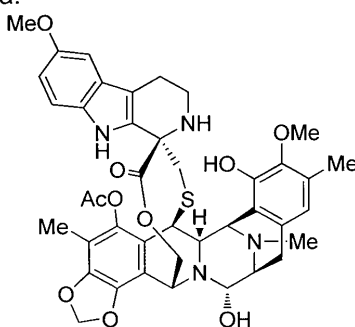
Desde a década de 1950, avanços significativos foram realizados no gerenciamento quimioterápico de câncer. Infelizmente, mais de 50% de todos os pacientes com câncer não respondem à terapia inicial ou experimentam recaídas após a resposta inicial ao tratamento e, por fim, morrem de doença metastática progressiva. Assim, o compromisso contínuo com a projeção e descoberta de novos agentes anticâncer é criticamente importante.

A quimioterapia, em sua forma clássica, foi focada primariamente em matar rapidamente células cancerígenas em proliferação ao visar processos metabólicos celulares gerais, incluindo DNA, RNA, e biossíntese de proteína. Drogas quimioterápicas são divididas em vários grupos com base em como afetam substâncias químicas específicas dentro de células cancerígenas, em quais atividades ou processos celulares a droga interfere, e quais fases específicas do ciclo celular a droga afeta. Os tipos mais comumente utilizados de drogas quimioterápicas incluem: drogas de alquilação de DNA (tais como ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatina, carboplatina, dacarbazina), antimetabólitos (5-fluorouracil, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina), inibidores mitóticos (tais como paclitaxel, docetaxel, vimblastina, vincristina), antibióticos anticâncer (tais como daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, idarrubicina, mitoxantrona), inibidores de topoisomerase I e/ou II (tais como topotecano, irinotecano, etopósido, tenipósido), e terapia hormonal (tal como tamoxifeno, flutamida).

A droga antitumoral ideal mataria células cancerígenas seletivamente, com um amplo índice em relação a sua toxicidade em direção a células não cancerígenas e também conservaria sua eficácia contra células cancerígenas, mesmo após a exposição prolongada à droga. Infelizmente, nenhuma das quimioterapias atuais com esses agentes possui um perfil ideal. A maioria possui índices terapêuticos muito limitados, adicionalmente, células cancerígenas

expostas a concentrações sub-letais de um agente quimioterápico podem desenvolver resistência a um agente tal, e, muito frequentemente, quite uma resistência cruzada a vários outros agentes antitumorais.

- 5 PM01183, também conhecido como triptamicidina, é um alcaloide sintético que está atualmente em testes clínicos para o tratamento de câncer, e tem a seguinte estrutura química:



- PM01183 demonstrou uma atividade *in vitro* altamente potente contra linhagens celulares tumorais sólidas e não sólidas bem como uma atividade *in vivo* significativa em várias linhagens celulares tumorais humanas xenograftadas em camundongos, tais como aquelas para câncer de mama, rim e ovário. PM01183 exerce seus efeitos anticâncer através da modificação covalente de guaninas no sulco menor de DNA que eventualmente dá origem à quebra da fita dupla de DNA, interrupção da fase S e apoptose em células cancerígenas.
- 15 Informações adicionais em relação a esse composto podem ser encontradas em WO 03/01427; 100th AACR Annual Meeting, 18-22 de Abril de 2009, Denver, CO, Resumo Nr. 2679 e Resumo Nr. 4525; e Leal JFM *et al. Br. J. Pharmacol.* 2010, 161, 1099-1110.

- 20 Uma vez que o câncer é uma causa principal de morte em animais e humanos, vários esforços foram e estão sendo feitos a fim de obter uma terapia ativa e segura para ser administrada a pacientes sofrendo de um câncer. O problema a ser resolvido pela presente invenção é prover terapias anticâncer que são úteis no tratamento de câncer.

RESUMO DA INVENÇÃO

- 25 A presente invenção estabelece que PM01183 potencializa a atividade antitumoral de outros agentes anticâncer, em particular outras drogas anticâncer selecionadas dentre complexos de coordenação de platina antitumorais, antimetabólitos, inibidores mitóticos, antibióticos anticâncer, inibidores de topoisomerase I e/ou II, inibidores de proteassoma, inibidores de histona

deacetilase, agentes de alquilação de mostarda de nitrogênio, agentes de alquilação de nitrosureia, agentes alquilantes não clássicos, antagonistas de estrogênio, antagonistas de andrógeno, inibidores de mTOR, inibidores de tirosina quinase e outros agentes selecionados dentre aplidina, ET-743, PM02734 e
5 PM00104. Portanto, PM01183 e referidos outros agentes anticâncer podem ser utilizados com sucesso em terapia de combinação para o tratamento de câncer.

Assim, esta invenção é direcionada a composições farmacêuticas, kits, métodos para o tratamento de câncer utilizando essas terapias de combinação e usos de ambas as drogas no tratamento de câncer e na fabricação de
10 medicamentos para terapias de combinação.

De acordo com um aspecto desta invenção, provemos terapias de combinação eficazes para o tratamento de câncer com base em PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, e utilização de outra droga anticâncer conforme definido acima.

15 Em outra modalidade, a invenção é direcionada a PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, para uso no tratamento de câncer compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente efetiva de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, em combinação com uma quantidade terapêuticamente efetiva de outra droga anticâncer.

20 Em outra modalidade, a invenção engloba um método de tratamento de câncer compreendendo a administração a um paciente necessitando de tal tratamento de uma quantidade terapêuticamente efetiva de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, e uma quantidade terapêuticamente efetiva de outra droga anticâncer.

25 Em outro aspecto, a invenção engloba um método de aumentar ou potencializar a eficácia terapêutica de uma droga anticâncer no tratamento de câncer, que compreende a administração a um paciente necessitando da mesma de uma quantidade terapêuticamente efetiva de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, em conjunção com essa outra droga
30 anticâncer.

Em outra modalidade, a invenção engloba o uso de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer através de terapia de combinação empregando PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, com outra droga
35 anticâncer.

Em um aspecto adicional, a invenção engloba uma composição farmacêutica compreendendo PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, e/ou outra droga anticâncer, e um transportador farmacêuticamente aceitável, a ser utilizado em terapia de combinação para o tratamento de câncer.

5 A invenção também engloba um kit para uso no tratamento de câncer, que compreende uma forma de dosagem de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, e/ou uma forma de dosagem de outra droga anticâncer, e instruções para o uso de ambas as drogas em combinação.

10 Em um aspecto preferencial, a presente invenção é relativa a combinações sinérgicas de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, com outra droga anticâncer.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig 1-20. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com oxaliplatina, 5-fluorouracil, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, 15 daunorrubicina, mitomicina C, actinomicina D, topotecano, etopósido, bortezomibe, vorinostat, ciclofosfamida, carmustina, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, ET-743 e PM00104 respectivamente contra células A549.

Fig 21-41. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, citarabina, gemcitabina, docetaxel, vincristina, vinorelbina, 20 daunorrubicina, mitomicina C, actinomicina D, topotecano, etopósido, vorinostat, ciclofosfamida, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, apolidina, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células A673.

Fig 42-56. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, 5-fluorouracil, citarabina, metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, 25 mitomicina C, topotecano, irinotecano, etopósido, dacarbazina, temsirolimus, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células SK-MEL-2.

Fig 57-80. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, paclitaxel, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, 30 actinomicina D, topotecano, irinotecano, etopósido, bortezomibe, vorinostat, flutamida, temsirolimus, erlotinibe, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células PC-3.

Fig 81-98. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, citarabina, gemcitabina, metotrexato, daunorrubicina, 35 doxorubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, etopósido, bortezomibe,

vorinostat, temsirolimus, erlotinibe, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células PANC-1.

5 Fig 99-123. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato, paclitaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, etopósido, bortezomibe, vorinostat, ciclofosfamida, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, aplidina, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células HGC-27.

10 Fig 124-150. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, paclitaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D, mitomicina C, topotecano, irinotecano, etopósido, vorinostat, ciclofosfamida, carmustina, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, aplidina, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células IGROV-1.

15 Fig 151-170. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, paclitaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, topotecano, irinotecano, etopósido, bortezomibe, ciclofosfamida, erlotinibe, ET-743 e PM00104 respectivamente contra células HEP-G2.

20 Fig 171-197. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, paclitaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D, mitomicina C, topotecano, irinotecano, etopósido, vorinostat, ciclofosfamida, carmustina, dacarbazina, tamoxifeno, temsirolimus, erlotinibe, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células MDA-MB-231.

25 Fig 198-219. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, docetaxel, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D, mitomicina C, topotecano, irinotecano, etopósido, bortezomibe, vorinostat, ciclofosfamida, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, aplidina e PM02734 respectivamente contra células HT-29.

30 Fig 220-242. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D, mitomicina C, topotecano, irinotecano, etopósido, vorinostat, ciclofosfamida, dacarbazina,

35 C, topotecano, irinotecano, etopósido, vorinostat, ciclofosfamida, dacarbazina,

erlotinibe, aplidina, ET-743, PM02734 e PM00104 respectivamente contra células RXF-393.

Fig 243-262. Dados de atividade *in vitro* de PM01183 em combinação com cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, vincristina, daunorrubicina, doxorubicina, topotecano, irinotecano, etopósido, bortezomibe, vorinostat, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, aplidina, ET-743 e PM02734 respectivamente contra células U87-MG.

Fig 263. Avaliação de volume de tumor de tumores A2780 em camundongos tratados com placebo, PM01183, paclitaxel e PM01183 mais paclitaxel.

Fig 264. Avaliação de volume de tumor de tumores A2780 em camundongos tratados com placebo, PM01183, vinorelbina e PM01183 mais vinorelbina.

Fig 265. Avaliação de volume de tumor de tumores A2780 em camundongos tratados com placebo, PM01183, doxorubicina e PM01183 mais doxorubicina.

Fig 266. Avaliação de volume de tumor de tumores HGC-27 em camundongos tratados com placebo, PM01183, cisplatina e PM01183 mais cisplatina.

Fig 267. Avaliação de volume de tumor de tumores HGC-27 em camundongos tratados com placebo, PM01183, 5-fluorouracil e PM01183 mais 5-fluorouracil.

Fig 268. Avaliação de volume de tumor de tumores SW1990 em camundongos tratados com placebo, PM01183, gemcitabina e PM01183 mais gemcitabina.

Fig 269. Avaliação de volume de tumor de tumores U87-MG em camundongos tratados com placebo, PM01183, temozolomida e PM01183 mais temozolomida.

Fig 270. Avaliação de volume de tumor de tumores H460 em camundongos tratados com placebo, PM01183, irinotecano e PM01183 mais irinotecano.

Fig 271. Avaliação de volume de tumor de tumores HT1080 em camundongos tratados com placebo, PM01183, dacarbazina e PM01183 mais dacarbazina.

Fig 272. Avaliação de volume de tumor de tumores HT-29 em camundongos tratados com placebo, PM01183, irinotecano e PM01183 mais irinotecano.

Fig 273. Efeitos da combinação de PM01183 com metotrexato em linhagem celular JURKAT.

Fig 274. Efeitos da combinação de PM01183 com metotrexato em linhagem celular MOLT-4.

5 Fig 275. Efeitos da combinação de PM01183 com daunorrubicina em linhagem celular JURKAT.

Fig 276. Efeitos da combinação de PM01183 com aplidina em linhagem celular JURKAT.

10 Fig 277. Efeitos da combinação de PM01183 com aplidina em linhagem celular MOLT-4.

Fig 278. Efeitos da combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular JURKAT.

Fig 279. Efeitos da combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular MOLT-4.

15 Fig 280. Efeitos da combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular JURKAT.

Fig 281. Efeitos da combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular MOLT-4.

20 Fig 282. Efeitos da combinação de PM01183 com PM02734 em linhagem celular JURKAT.

Fig 283. Efeitos da combinação de PM01183 com PM02734 em linhagem celular MOLT-4.

Fig 284. Efeitos da combinação de PM01183 com citarabina em linhagem celular RAMOS.

25 Fig 285. Efeitos da combinação de PM01183 com metotrexato em linhagem celular RAMOS.

Fig 286. Efeitos da combinação de PM01183 com metotrexato em linhagem celular U-937.

30 Fig 287. Efeitos da combinação de PM01183 com gemcitabina em linhagem celular RAMOS.

Fig 288. Efeitos da combinação de PM01183 com gemcitabina em linhagem celular U-937.

Fig 289. Efeitos da combinação de PM01183 com daunorrubicina em linhagem celular RAMOS.

35 Fig 290. Efeitos da combinação de PM01183 com daunorrubicina em linhagem celular U-937.

Fig 291. Efeitos da combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular RAMOS.

Fig 292. Efeitos da combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular U-937.

5 Fig 293. Efeitos da combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular RAMOS.

Fig 294. Efeitos da combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular U-937.

10 Fig 295. Efeitos da combinação de PM01183 com PM02734 em linhagem celular RAMOS.

Fig 296. Efeitos da combinação de PM01183 com PM02734 em linhagem celular U-937.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

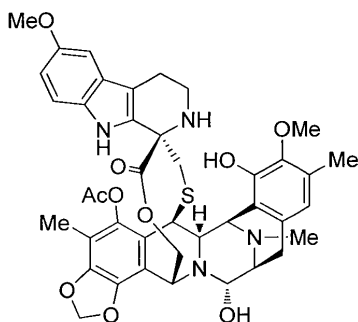
15 Verificamos que PM01183 aprimora em grande medida a atividade anticâncer de outras drogas anticâncer quando essas drogas anticâncer estão em combinação com PM01183. Assim, a presente invenção é direcionada para prover um tratamento de câncer eficiente com base na combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com outra droga anticâncer.

20 No presente pedido, por "câncer", pretende-se incluir tumores, neoplasias e qualquer outra doença maligna tendo como causa tecidos ou células malignas.

O termo "tratar", conforme utilizado aqui, a menos que indicado de outro modo, significa reverter, aliviar ou inibir o progresso da doença ou condição à qual o termo se aplica, ou um ou mais sintomas de tal distúrbio ou condição. O termo "tratamento", conforme utilizado aqui, a menos que indicado de outro modo, refere-se ao ato de tratar, como "tratar" é definido imediatamente acima.

25 O termo "combinação" conforme utilizado ao longo do relatório descritivo, pretende-se englobar a administração a um paciente sofrendo de câncer dos referidos agentes terapêuticos na mesma ou em formulações separadas, e ao mesmo tempo ou em tempos diferentes. Caso os agentes terapêuticos sejam administrados em tempos diferentes, eles devem ser administrados suficientemente próximos em tempo para prover a ocorrência da resposta de potencialização ou sinérgica.

Conforme mencionado acima, PM01183 é um alcaloide sintético, tendo a seguinte estrutura:



O termo "PM01183" é pretendido aqui para cobrir qualquer sal farmacologicamente aceitável, solvato, hidrato, pró-droga, ou qualquer outro composto que, mediante administração ao paciente, é capaz de prover (direta ou indiretamente) o composto conforme descrito aqui. A preparação de sais, solvatos, hidratos e pró-drogas pode ser executada através de métodos conhecidos na técnica.

Sais farmacologicamente aceitáveis podem ser sintetizados a partir de um composto de origem, que contém uma porção ácida ou básica, através de métodos químicos convencionais. Geralmente, tais sais são, por exemplo, preparados através da reação das formas ácidas ou básicas desses compostos com uma quantidade estequiométrica da base ou ácido apropriado em água ou em um solvente orgânico ou em uma mistura de ambos. Geralmente, meios não aquosos como éter, acetato de etil, etanol, isopropanol ou acetonitrila são preferenciais. Exemplos de sais de adição de ácido incluem sais de adição de ácido mineral, tal como, por exemplo, hidrocloreto, hidrobrometo, hidriodeto, sulfato, nitrato, fosfato e sais de adição de ácido orgânico, tal como, por exemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanossulfonato e p-toluenossulfonato. Exemplos de sais de adição de álcali incluem sais inorgânicos, tais como, por exemplo, sais de sódio, potássio, cálcio e amônio, e sais álcali orgânicos, tais como, por exemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquil-etanolamina, trietanolamina e sais de aminoácidos básicos.

Qualquer composto que é uma pró-droga de PM01183 está dentro do escopo e espírito da invenção. O termo "pró-droga" é utilizado em seu sentido mais amplo e engloba aqueles derivados que são convertidos *in vivo* em PM01183. A pró-droga pode hidrolisar, oxidar ou reagir de outro modo sob condições biológicas para prover PM01183. Exemplos de pró-drogas incluem, mas não se limitam a, derivados e metabólitos de PM01183 que incluem porções

bio-hidrolisáveis, tais como amidas bio-hidrolisáveis, ésteres bio-hidrolisáveis, carbamatos bio-hidrolisáveis, carbonatos bio-hidrolisáveis, ureídeos bio-hidrolisáveis e análogos de fosfato bio-hidrolisáveis. As pró-drogas podem tipicamente ser preparados utilizando métodos bem conhecidos, tais como

5 aqueles descritos por Burger em “Medicinal Chemistry e Drug Discovery” 6^a. ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) e “Design e Applications of Prodrugs” (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers).

Adicionalmente, qualquer droga referida aqui pode estar na forma amorfa ou forma cristalina como composto livre ou como solvatos (por exemplo, hidratos)

10 e pretende-se que ambas as formas estejam dentro do escopo da presente invenção. Métodos de solvatação são geralmente conhecidos dentro da técnica.

Além disso, PM01183 para uso de acordo com a presente invenção pode ser preparado seguindo o processo sintético, tal como aquele descrito em WO 03/014127, que está incorporado aqui por referência.

15 Composições farmacêuticas de PM01183, ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, que podem ser utilizadas incluem soluções, suspensões, emulsões, composições liofilizadas, etc., com excipientes adequados para administração intravenosa. Preferencialmente, PM01183 pode ser fornecido e armazenado como um produto liofilizado estéril, compreendendo PM01183 e

20 excipientes em uma formulação adequada para uso terapêutico. Para direcionamento adicional sobre composições farmacêuticas de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, vide, por exemplo, as formulações descritas em WO 2006/046079, que está incorporado aqui por referência.

A administração de PM01183, ou um sal farmacêuticamente aceitável do

25 mesmo, ou composições farmacêuticas compreendendo o composto, é preferencialmente através de infusão intravenosa. Tempos de Infusão de até 72 horas podem ser utilizados, mais preferencialmente entre 1 e 24 horas, com cerca de 1 hora ou cerca de 3 horas mais preferencial. Tempos de infusão curtos que permitem que o tratamento seja executado em um pernoite no hospital são

30 especialmente desejáveis. No entanto, a infusão pode ser em torno de 24 horas ou até mesmo mais longo, caso requerido.

Preferencialmente, a administração de PM01183 é desempenhada em ciclos. Em um cronograma de administração preferencial, uma infusão intravenosa de PM01183 é dada aos pacientes na primeira semana de cada ciclo

35 e permite-se que os pacientes se recuperam durante o restante do ciclo. A duração preferencial de cada ciclo é de 3 ou 4 semanas. Ciclos múltiplos podem

ser dados, conforme necessário. A administração de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, através de infusão intravenosa durante cerca de 1 hora uma vez a cada 3 semanas é o cronograma de administração mais preferencial, embora outros protocolos possam ser planejados como variações.

Na presente invenção, é particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com outra droga anticâncer selecionada dentre complexos de coordenação de platina antitumorais, antimetabólitos, inibidores mitóticos, antibióticos anticâncer, inibidores de topoisomerase I e/ou II, inibidores de proteassoma, inibidores de histona deacetilase, agentes de alquilação de mostarda de nitrogênio, agentes de alquilação de nitrosureia, agentes alquilantes não clássicos, antagonistas de estrogênio, antagonistas de andrógeno, inibidores de mTOR, inibidores de tirosina quinase, e outros agentes selecionados dentre aplidina, ET-743, PM02734 e PM00104 no tratamento de câncer.

Tipos de câncer particularmente preferenciais são aqueles selecionados dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de bexiga, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, câncer de tireoide, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma (também conhecido como câncer de fígado), câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer esofágico, neuroblastoma, câncer cerebral, câncer cervical, câncer anal, câncer testicular, leucemia, mieloma múltiplo e linfoma.

Em uma modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um complexo de coordenação de platina antitumoral no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, cisplatina, oxaliplatina, carboplatina, tetranitrato de triplatina (BBR3464), satraplatina, tetraplatina, ormiplatina, iproplatina, nedaplatina e lobaplatina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com cisplatina, oxaliplatina, carboplatina, tetranitrato de triplatina, satraplatina, tetraplatina, ormiplatina, iproplatina, nedaplatina e lobaplatina, e ainda mais preferencial é a combinação com cisplatina e oxaliplatina no tratamento de

câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral.

5 Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com um antimetabólito no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de bexiga, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma
10 gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer esofágico, câncer cerebral, câncer anal, leucemia e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, 5-fluorouracil, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, fludarabina, aminopterin, metotrexato, pemetrexede, raltitrexede, cladribina, clofarabina, mercaptopurina,
15 pentostatina e tioguanina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com 5-fluorouracil, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, fludarabina, aminopterin, metotrexato, pemetrexede, raltitrexede, cladribina, clofarabina, mercaptopurina, pentostatina e tioguanina, e ainda mais preferencial é a
20 combinação com 5-fluorouracil, gemcitabina, citarabina e metotrexato no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral,
25 leucemia e linfoma.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com um inibidor mitótico no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um
30 câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, câncer de próstata, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral, leucemia, e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, paclitaxel, docetaxel, vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com paclitaxel,
35 docetaxel, vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina, e ainda mais preferencial é a combinação com paclitaxel, docetaxel, vincristina e vinorelbina no

tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, câncer de próstata, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral.

- 5 Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um antibiótico anticâncer no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de bexiga, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, câncer de tireoide, carcinoma
- 10 gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, neuroblastoma, câncer cerebral, câncer anal, câncer testicular, leucemia, mieloma múltiplo e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, pixantrona, valrubicina, mitomicina C, bleomicina, actinomicina A e mitramicina. É
- 15 particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, pixantrona, valrubicina, mitomicina C, bleomicina, actinomicina D e mitramicina, e ainda mais preferencial é a combinação com daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina C e actinomicina D no
- 20 tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral, leucemia e linfoma.

- 25 Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um inibidor de topoisomerase I e/ou II no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, neuroblastoma,
- 30 câncer cerebral, câncer cervical, câncer testicular, leucemia e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, topotecano, SN-38, irinotecano, camptotecina, rubitecano, etopósido, ansacrina e tenipósido. É particularmente preferencial a combinação de PM00104, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com topotecano, SN-38, irinotecano, camptotecina, rubitecano,
- 35 etopósido, ansacrina e tenipósido, e ainda mais preferencial é a combinação com topotecano, irinotecano e etopósido no tratamento de câncer, e mais

particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, e câncer cerebral.

- 5 Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um inibidor de proteassoma no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, hepatoma, câncer colorretal, câncer cerebral, mieloma múltiplo e linfoma.
- 10 Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, bortezomibe, dissulfiram, epigalocatequina galato e salinosporamida A. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com bortezomibe, dissulfiram, epigalocatequina galato, e salinosporamida A, e ainda mais preferencial é a combinação com bortezomibe
- 15 no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, hepatoma, câncer colorretal e câncer cerebral.

- Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um inibidor
- 20 de histona deacetilase no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, romidepsina, panobinostat, vorinostat, mocetinostat,
- 25 belinostat, entinostat, resminostat, PCI-24781, AR-42, CUDC-101, e ácido valproico. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com romidepsina, panobinostat, vorinostat, mocetinostat, belinostat, entinostat, resminostat, PCI-24781, AR-42, CUDC-101, e ácido valproico, e ainda mais preferencial é a combinação com
- 30 vorinostat no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral.

- Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação
- 35 de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um agente de alquilação de mostarda de nitrogênio no tratamento de câncer, e mais

particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, carcinoma de bexiga, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, leucemia, mieloma múltiplo e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, melfalano, ifosfamida, clorambucila, 5 ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, estramustina e bendamustina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com melfalano, ifosfamida, clorambucila, ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, estramustina e bendamustina, e ainda mais preferencial é a combinação com ciclofosfamida no tratamento de câncer, e 10 mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal e câncer renal.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com um agente 15 de alquilação de nitrosureia no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cerebral, mieloma múltiplo e linfoma. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, lomustina, semustina, carmustina, fotemustina e estreptozotocina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal 20 farmaceuticamente aceitável do mesmo, com lomustina, semustina, carmustina, fotemustina e estreptozotocina, e ainda mais preferencial é a combinação com carmustina no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, câncer de ovário e câncer de mama.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação 25 de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com um agente alquilante não clássico no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral, leucemia e linfoma. Esse grupo 30 quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, procarbazina, dacarbazina, temozolomida e altretamina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com procarbazina, dacarbazina, temozolomida e altretamina, e ainda mais preferencial é a combinação com dacarbazina e tezolomide no tratamento de câncer de pulmão, 35 sarcoma, melanoma maligno, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um antagonista de estrogênio no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de mama. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, toremifeno, fulvestranto, tamoxifeno e nafoxidina. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com toremifeno, fulvestranto, tamoxifeno e nafoxidina, e ainda mais preferencial é a combinação com tamoxifeno no tratamento de câncer de mama.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um antagonista de andrógeno no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de próstata. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, bicalutamida, flutamida, MDV3100 e nilutamida. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com bicalutamida, flutamida, MDV3100 e nilutamida, e ainda mais preferencial é a combinação com flutamida no tratamento de câncer de próstata.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um inibidor mTOR no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, sirolimus, temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, KU-0063794 e WYE-354. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com sirolimus, temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, KU-0063794 e WYE-354, e ainda mais preferencial é a combinação com temsirolimus no tratamento de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal e câncer cerebral.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com um inibidor de tirosina quinase no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral. Esse grupo quimioterapêutico inclui, mas não se limita a, erlotinibe, sorafenibe,

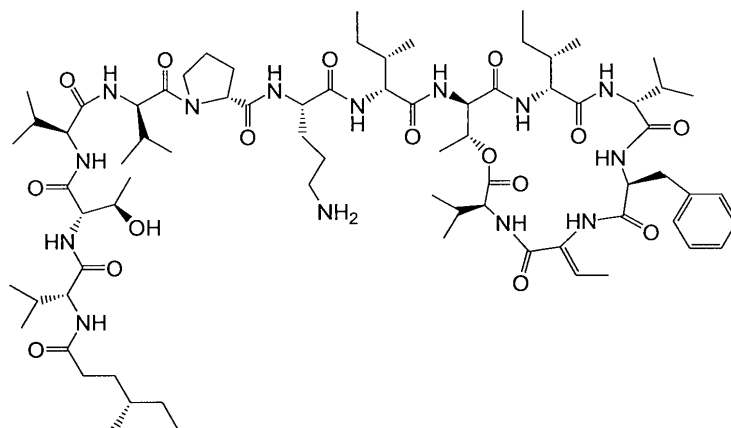
axitinibe, bosutinibe, cediranibe, crizotinibe, dasatinibe, gefitinibe, imatinibe, canertinibe, lapatinibe, lestaurtinibe, neratinibe, nilotinibe, semaxanibe, sunitinibe, vatalanibe e vandetanibe. É particularmente preferencial a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com erlotinibe, sorafenibe, axitinibe, bosutinibe, cediranibe, crizotinibe, dasatinibe, gefitinibe, imatinibe, canertinibe, lapatinibe, lestaurtinibe, neratinibe, nilotinibe, semaxanibe, sunitinibe, vatalanibe e vandetanibe, e ainda mais preferencial é a combinação com erlotinibe no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal e câncer cerebral.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com aplidina no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre sarcoma, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral e leucemia.

Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com ET-743 (trabectedina) no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer renal, leucemia e linfoma.

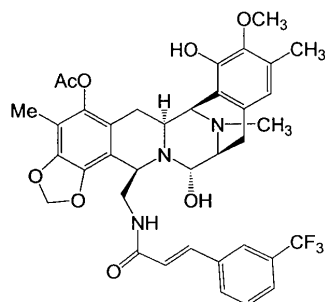
Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com PM02734 no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer cerebral, leucemia e linfoma.

PM02734 ((4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-*allo*-Ile-ciclo(D-*allo*-Thr-D-*allo*-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val)) é um decapeptídeo sintético relacionado à família de compostos de kahalalide, que está atualmente em testes clínicos para o tratamento de câncer. Esse composto é o objeto de WO 2004/035613 e tem a seguinte estrutura:



Em outra modalidade preferencial, a invenção é direcionada à combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com PM00104 no tratamento de câncer, e mais particularmente no tratamento de um câncer selecionado dentre câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer renal, leucemia e linfoma.

PM00104 é um alcaloide sintético relacionado a joromicina e renieramicinas, e também a compostos de safracina e saframicina, que está atualmente em testes clínicos para o tratamento de câncer, e tem a seguinte estrutura:



Para detalhes adicionais sobre PM00104 vide WO 01/87894.

A invenção inclui qualquer sal farmacologicamente aceitável de qualquer droga referida aqui, que pode ser sintetizada a partir do composto de origem através de métodos químicos convencionais conforme divulgado acima.

Em uma modalidade, a invenção refere-se a combinações sinérgicas empregando PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima. Uma indicação de sinergismo pode ser obtida através dos testes das combinações e

análise dos resultados, por exemplo, através do Método de Chou-Talalay ou através de qualquer outro método adequado, tal como aqueles providos na seção Exemplos.

As possíveis consequências favoráveis para o sinergismo incluem 1) aumento da eficácia do efeito terapêutico, 2) diminuição da dosagem, mas aumento ou manutenção da mesma eficácia para evitar toxicidade, 3) minimização ou retardamento do desenvolvimento de resistência à droga, e 4) provimento de sinergismo seletivo contra alvo (ou sinergismo de eficácia) versus hospedeiro (ou antagonismo de toxicidade). Consequentemente, em uma combinação de dois agentes quimioterápicos tendo sinergismo, o regime de tratamento será diferente daqueles em que a combinação das duas drogas shows apenas um efeito aditivo. Nesse sentido, caso haja sinergismo, dosagem menor de um ou ambos os agentes (em comparação com as quantidades utilizadas em terapia única) pode ser requerida para obter a mesma eficácia ou uma ainda maior, e os possíveis efeitos colaterais tóxicos podem ser reduzidos ou então evitados. Alternativamente, caso a dosagem de ambas as drogas na combinação seja a mesma que aquela dada isoladamente (como agentes únicos), um aumento em eficácia da combinação pode ser esperado. Portanto, a existência de sinergismo em uma dada combinação de droga modificará a extensão do tratamento e/ou do regime de tratamento.

Em outra modalidade, a invenção refere-se a um método de aumento ou potencialização da eficácia terapêutica de uma droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima no tratamento de câncer, que compreende a administração a um paciente necessitando da mesma de uma quantidade terapeuticamente efetiva de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em conjunção com essa outra droga anticâncer. Uma indicação de aumento ou potencialização da eficácia terapêutica pode ser obtida através do teste das combinações e análise dos resultados, por exemplo, a inibição do crescimento do tumor. Essa inibição do crescimento do tumor pode ser avaliada através da comparação do volume médio do tumor do tratamento combinando as duas drogas (PM01183 e a outra droga) com aqueles da do tratamento de monoterapia de outra droga. Nesse sentido, o aumento ou potencialização da eficácia terapêutica é determinado quando a resposta da terapia de combinação é maior que a melhor resposta da droga mais ativa administrada como agente único (monoterapia) no mesmo cronograma e dose conforme utilizado na terapia de

combinação. Esse aspecto da invenção é adicionalmente ilustrado na seção Exemplos, especialmente nos Exemplos 13-19.

5 Em outro aspecto, a invenção é direcionada ao uso de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer através de terapia de combinação empregando PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

10 Em um aspecto adicional, a invenção é direcionada a um método para o tratamento de câncer compreendendo administração a um paciente necessitando de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente efetiva de PM01183, ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em combinação com uma quantidade terapeuticamente efetiva de outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

15 Em outro aspecto, a invenção é direcionada a PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, para uso no tratamento de câncer compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em combinação com uma quantidade terapeuticamente efetiva de outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

20 De acordo com a presente invenção, PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e a outra droga anticâncer podem ser providos no mesmo medicamento ou como medicamentos separados para administração ao mesmo tempo ou em tempos diferentes. Preferencialmente, PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e a outra droga anticâncer são providos como medicamentos separados para administração em
25 tempos diferentes. Quando administrados separadamente e em tempos diferentes, tanto PM01183, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, quanto a outra droga anticâncer pode ser administrado primeiro. Adicionalmente, ambas as drogas podem ser administradas no mesmo dia ou em dias diferentes, e podem ser administradas utilizando o mesmo cronograma ou em cronogramas
30 diferentes durante o ciclo de tratamento. Adicionalmente, a administração de ambas as drogas pode ser feita através do uso da mesma via de administração ou diferentes vias. Por exemplo, ambas as drogas podem ser administradas através de administração intravenosa ou, alternativamente, uma droga pode ser
35 administrada oralmente e a outra através de administração intravenosa.

Assim, as composições farmacêuticas da presente invenção podem compreender todos os componentes (drogas) em uma única formulação farmacologicamente aceitável ou, alternativamente, os componentes podem ser formulados separadamente e administrados em combinação entre si. Várias formulações farmacologicamente aceitáveis bem conhecidas daqueles versados na técnica podem ser utilizadas na presente invenção. Além disso, a seleção de uma formulação apropriada para uso na presente invenção pode ser desempenhada por aqueles versados na técnica levando-se em consideração a via de administração e as características de solubilidade dos componentes da composição.

A dosagem correta de ambas as drogas em combinação variarão de acordo com a formulação particular, o modo de aplicação, e o local particular, paciente e tumor sendo tratado. Outros fatores como idade, peso corporal, sexo, dieta, tempo de administração, taxa de excreção, condição do paciente, outras combinações de droga, sensibilidades à reação e gravidade da doença devem ser considerados. A administração pode ser executada continuamente ou periodicamente dentro da dose máxima tolerada.

A combinação da invenção pode ser utilizada isoladamente ou em combinação com um ou mais dentre uma variedade de agentes anticâncer ou agentes de cuidado de apoio.

Adicionalmente, dependendo do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento da doença, efeitos anticâncer dos tratamentos da presente invenção incluem, mas não se limitam a, inibição de crescimento do tumor, atraso no crescimento do tumor, regressão do tumor, encolhimento do tumor, maior tempo de recrescimento do tumor em cessação de tratamento, retardamento da progressão da doença, e prevenção de metástase. Espera-se que, quando um tratamento da presente invenção é administrado a um paciente, tal como um paciente humano, necessitando de tal tratamento, o referido tratamento produzirá um efeito, conforme medido por, por exemplo, a extensão do efeito anticâncer, a taxa de resposta, o tempo para a progressão da doença, ou a taxa de sobrevivência. Em particular, os tratamentos da invenção são adequados para pacientes humanos, especialmente aqueles que estão recaindo ou refratários à quimioterapia anterior. Terapia de primeira linha é também contemplada.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um kit para uso no tratamento de câncer, compreendendo um suprimento de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em unidades de dosagem durante pelo

menos um ciclo, e instruções impressas para o uso de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima em combinação.

5 Em um aspecto relacionado, a presente invenção é direcionada a um kit para uso no tratamento de câncer, compreendendo um suprimento de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em unidades de dosagem durante pelo menos um ciclo, um suprimento de outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima em unidades de dosagem durante pelo menos um ciclo, e instruções impressas para o uso de ambas as
10 drogas em combinação.

Em outro aspecto, a presente invenção também provê uma composição farmacêutica compreendendo PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um transportador farmacologicamente aceitável ou excipiente, para uso em combinação com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de
15 drogas dada acima no tratamento de câncer.

Em um aspecto adicional, a presente invenção também provê uma composição farmacêutica compreendendo PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima, e um transportador farmacologicamente
20 aceitável. Essa composição farmacêutica é preferível para uso no tratamento de câncer.

Em outro aspecto, a invenção adicionalmente provê o uso de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, na preparação de uma composição para uso em combinação com outra droga anticâncer selecionada
25 dentre a lista de drogas dada acima no tratamento de câncer.

Em outro aspecto, a invenção adicionalmente provê para o uso de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para o tratamento de câncer, em terapia de combinação com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

30 Em uma modalidade, células cancerígenas são contatadas, ou tratadas de outro modo, com uma combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima. As células cancerígenas são preferencialmente humanas e incluem células de carcinoma, células de sarcoma, células de leucemia, células
35 de linfoma e células de mieloma. Mais preferencialmente, as células cancerígenas são células de câncer de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de

bexiga, câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, câncer de tireoide, carcinoma gástrico, câncer de ovário, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer renal, câncer esofágico, neuroblastoma, câncer cerebral, câncer cervical, câncer anal, câncer testicular, leucemia, mieloma múltiplo e linfoma. Adicionalmente, a
5 combinação provê um efeito inibitório sinérgico contra as células cancerígenas, particularmente contra as células cancerígenas humanas mencionadas acima.

Por exemplo, a combinação inibe a proliferação ou sobrevivência de células cancerígenas contatadas. Um nível inferior de proliferação ou sobrevivência das células cancerígenas contatadas em comparação às células
10 cancerígenas não contatadas suporta a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima como sendo eficaz para o tratamento de um paciente com câncer.

Em outro aspecto, a invenção provê for um método para inibição do
15 crescimento de células cancerígenas compreendendo o contato de referidas células cancerígenas com uma quantidade eficaz de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em combinação com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

Em outro aspecto, a invenção provê for um método para inibição do
20 crescimento de células cancerígenas compreendendo o contato de células cancerígenas com uma combinação sinérgica de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima, em que a referida combinação provê maior inibição contra crescimento de células cancerígenas em comparação a (i)
25 PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, na ausência da outra droga anticâncer, ou (ii) a outra droga anticâncer na ausência de PM01183.

Em outro aspecto, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação sinérgica de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada
30 dentre a lista de drogas dada acima para inibição do crescimento de células cancerígenas, em que referida combinação provê maior inibição contra crescimento de células cancerígenas em comparação a (i) PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, na ausência da outra droga anticâncer, ou (ii) a outra droga anticâncer na ausência de PM01183.

35 Em outra modalidade, a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada

dentre a lista de drogas dada acima inibe o crescimento do tumor ou reduz o tamanho de um tumor *in vivo*. Em particular, a combinação inibe *in vivo* o crescimento e/ou reduz o tamanho de carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, e mieloma. Preferencialmente, a combinação inibe crescimento *in vivo* do tumor de pulmão, sarcoma, melanoma maligno, bexiga, próstata, pâncreas, tireoide, gástrico, ovariano, hepatoma, mama, colorretal, rim, esofágico, neuroblastoma, cerebral, cervical, anal, testicular, leucemia, mieloma múltiplo e linfoma.

Por exemplo, essas combinações inibem o crescimento do tumor ou reduzem o tamanho de xenoenxertos de câncer humano, particularmente xenoenxertos de tumor gástrico humano, de pâncreas, sarcoma, pulmão, colorretal e ovário, em modelos animais. Um crescimento reduzido ou tamanho reduzido de xenoenxertos de câncer humano em modelos animais administrados com essas combinações adicionalmente suporta a combinação de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima como sendo eficaz para o tratamento de um paciente com câncer.

Portanto, em outro aspecto, a invenção provê um método para reduzir o tamanho de um tumor, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em combinação com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

Em outro aspecto, a invenção provê um método para inibição do crescimento do tumor, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em combinação com outra droga anticâncer selecionada dentre a lista de drogas dada acima.

Os exemplos a seguir adicionalmente ilustram a invenção. Esses exemplos não devem ser interpretados como uma limitação do escopo da invenção.

A fim de prover uma descrição mais concisa, algumas das expressões quantitativas dadas aqui não são qualificadas com o termo "cerca de". Entende-se que, se o termo "cerca de" é utilizado explicitamente ou não, cada quantidade dada aqui é pretendida para se referir a um valor dado real, e é também pretendido para referir à aproximação de tal valor dado que seria razoavelmente inferida com base na habilidade comum na técnica em, incluindo equivalentes e aproximações devido a condições experimentais e/ou de medição para dado valor tal.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano.

5 O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de carcinoma de pulmão.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: oxaliplatina, carmustina, ciclofosfamida, mitomicina C (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -
10 20°C), 5-fluorouracil (5-FU), gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, daunorrubicina, actinomicina D, topotecano, etopósido, bortezomibe, vorinostat, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparadas em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro
15 para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

A549 foi a linhagem celular de carcinoma de pulmão humano selecionada para esse ensaio. As células A549 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de
20 L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada em células A549 após 72 horas de exposição à droga. Brevemente, as
25 células foram colhidas e plantadas em placas para microtitulação com 96 poços em uma densidade de 5.000 células em 150 µL de meio de cultura e incubadas durante 24 horas em meio livre de droga antes do tratamento com veículo isolado ou compostos de teste durante 72 h.

O efeito citotóxico foi medido pelo ensaio de redução de MTT, em que
30 brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, um tetrazol, que é reduzido para formazan púrpura na mitocôndria de células vivas, foi utilizado. MTT (50µL de 1mg/ml de solução estoque) foi adicionado aos poços e incubado durante 8 horas em 37°C até que cristais de formazan fossem formados. Após resolver gentilmente o meio de cultura, DMSO foi adicionado para dissolver o
35 produto de formazan púrpura insolúvel em uma solução colorida. A absorvância dos poços foi quantificada através de medição da densidade óptica em 540 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de crescimento celular de controle. Os valores de IC₅₀ (concentração de droga que produz 50% de inibição de crescimento celular) utilizados para os estudos de comparação foram calculados utilizando o software Prism v5.02 (GraphPad). Os resultados foram expressos como concentração molar e representaram a média de 2-4 ensaios independentes.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor A549 são mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	3,60E-09	Oxaliplatina	9,00E-04	5-FU	9,23E-05
Gemcitabina	2,80E-10	Paclitaxel	4,00E-08	Docetaxel	3,00E-09
Vincristina	2,50E-07	Daunorrubicina	3,55E-07	Mitomicina C	2,49E-04
Actinomicina D	4,70E-09	Topotecano	8,00E-07	Etopósido	7,82E-07
Bortezomibe	3,10E-09	Vorinostat	6,81E-06	Ciclofosfamida	1,00E-03
Carmustina	1,00E-03	Dacarbazina	6,00E-04	Temsirolimus	3,29E-06
Erlotinibe	1,00E-05	ET-743	2,25E-08	PM00104	7,00E-09

10 b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano A549 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima. Os valores de IC₅₀ obtidos anteriormente foram utilizados como concentrações iniciais para cada composto (100% de concentração). Diluições arbitrárias, como porcentagem do valor IC₅₀ inicial (100%, 75%, 70%, 15 60%, 50%, 40%, 30%, 25% e 0%), foram desempenhadas para cada par de compostos e testadas em curvas de resposta à dose complementares (concentrações opostas) combinadas conforme segue:

IC₅₀ de PM01183

100%

75%

IC₅₀ de Agente

0%

25%

70%	30%
60%	40%
50%	50%
40%	60%
30%	70%
25%	75%
0%	100%

Como um auxílio visual, valores de resposta foram ilustrados em gráfico em um gráfico de dispersão com razões de dose dadas no eixo x e valores de resposta em % no eixo y. Uma linha horizontal foi desenhada entre os dois valores de resposta de ponto final (Por exemplo, entre os valores de resposta para 100% de IC₅₀ de PM01183 e 100% de IC₅₀ de agente quimioterápico padrão). Em casos em que valores de resposta nos dois pontos finais foram aproximadamente equivalentes, pontos estando acima ou abaixo dessa linha prevista de aditividade poderiam ser interpretados como representando interação de droga sinérgica ou antagonista, respectivamente.

10 As combinações *in vitro* de cada droga com PM01183 têm o potencial para serem sinérgicas, aditivas ou antagonistas. Citotoxicidade sinérgica para células de tumor é um efeito ótimo e implica em que a combinação de PM01183 com outra droga é mais eficaz que qualquer droga isoladamente.

15 De acordo com esse ensaio, verificou-se que em linhagem celular de carcinoma de pulmão humano A549:

a. A combinação de PM01183 com oxaliplatina exibiu sinergismo forte (Figura 1).

b. A combinação de PM0183 com 5-fluorouracil (Figura 2) e PM01183 com gemcitabina (Figura 3) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

20 c. A combinação de PM01183 com paclitaxel mostrou sinergismo (Figura 4) nas razões de dose de 50/50-40/60, enquanto que a combinação de PM01183 com docetaxel mostrou sinergismo (Figura 5) nas razões de dose de 75/25 e 50/50, e a combinação de PM01183 com vincristina exibiu sinergismo (Figura 6) em quase todas as razões de dose.

25 d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 7), PM01183 com mitomicina C (Figura 8), e PM01183 com actinomicina D (Figura 9) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose.

e. A combinação de PM01183 com topotecano mostrou sinergismo forte (Figura 10), enquanto que a combinação de PM01183 com etopósido mostrou sinergismo (Figura 11) nas razões de dose 60/40 e 25/75.

5 f. A combinação de PM01183 com bortezomibe mostrou sinergismo (Figura 12) nas razões de dose 40/60-30/70.

g. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 13) mostrou sinergismo forte em quase todas as razões de dose.

h. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 14) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

10 i. A combinação de PM01183 com carmustina exibiu sinergismo forte (Figura 15).

j. A combinação de PM01183 com dacarbazina mostrou sinergismo forte (Figura 16).

15 k. As combinações de PM01183 com temsirolimus mostrou sinergismo (Figura 17) em quase todas as razões de dose.

l. A combinação de PM01183 com erlotinibe mostrou sinergismo forte (Figura 18).

m. A combinação de PM01183 com ET-743 mostrou sinergismo (Figura 19) nas razões de dose 75/25-60/40 e 30/70.

20 n. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 20) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

EXEMPLO 2. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de sarcoma humano.

25 O objetivo desse estudo foi determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de sarcoma.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida, mitomicina C (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), gemcitabina, docetaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, citarabina, actinomicina D, topotecano, etopósido, vorinostat, dacarbazina, temsirolimus, erlotinibe, aplidina, PM02734, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em
35 série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter

uma concentração de 4X final. Aliquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

A673 foi a linhagem celular de rabdomiossarcoma humano selecionada para esse ensaio. As células A673 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor A673.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor A673 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,20E-09	Cisplatina	3,03E-05	Oxaliplatina	7,80E-05
Citarabina	1,97E-07	Gemcitabina	4,34E-10	Docetaxel	6,50E-10
Vincristina	8,60E-09	Vinorelbina	5,00E-08	Daunorrubicina	5,20E-07
Mitomicina C	2,99E-06	Actinomicina D	9,56E-10	Topotecano	2,40E-08
Etopósido	1,55E-06	Vorinostat	2,16E-06	Ciclofosfamida	1,00E-03
Dacarbazina	3,00E-04	Temsirolimus	1,00E-06	Erlotinibe	5,00E-05
Aplidina	2,16E-09	ET-743	1,90E-09	PM02734	3,60E-06
PM00104	3,00E-09				

b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano A673 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio, verificou-se que, na linhagem celular de sarcoma humano A673:

a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 21) e PM01183 com oxaliplatina (Figura 22) exibiu sinergismo forte.

b. A combinação de PM01183 com citarabina exibiu sinergismo forte (Figura 23), enquanto que a combinação de PM01183 com gemcitabina mostrou sinergismo (Figura 24) nas razões de dose de 75/25-70/30.

c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 25), PM01183 com vincristina (Figura 26) e PM01183 com vinorelbina (Figura 27) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 28) e PM01183 com actinomicina D (Figura 30) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com mitomicina C (Figura 29) exibiu sinergismo forte.

e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 31) e PM01183 com etopósido (Figura 32) exibiu sinergismo forte em quase todas as razões de dose.

f. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 33) mostrou sinergismo forte.

g. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 34) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

h. A combinação de PM01183 com dacarbazina mostrou sinergismo (Figura 35) nas razões de dose de 75/25-70/30 e 40/60.

i. As combinações de PM01183 com temsirolimus mostrou sinergismo forte (Figura 36).

j. A combinação de PM01183 com erlotinibe exibiu sinergismo forte (Figura 37).

k. A combinação de PM01183 com aplidina mostrou sinergismo (Figura 38) nas razões de dose de 50/50-30/70.

l. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 39) mostrou sinergismo nas razões de dose 30/70-25/75.

m. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 40) mostrou sinergismo nas 75/25 e 40/60 razões de dose 75/25 e 40/60.

n. A combinação de PM01183 com PM00104 exibiu sinergismo (Figura 41).

EXEMPLO 3. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de melanoma maligno humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de melanoma maligno.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, mitomicina C (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, doxorubicina, daunorrubicina, citarabina, topotecano, irinotecano, metotrexato, etopósido, dacarbazina, temsirolimus, PM02734, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

SK-MEL-2 foi a linhagem celular de melanoma humano selecionada para esse ensaio. As células SK-MEL-2 foram mantidas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEME) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor SK-MEL-2.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor SK-MEL-2 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,00E-09	Cisplatina	1,60E-04	5-FU	7,00E-04
Citarabina	3,89E-06	Metotrexato	1,00E-04	Daunorrubicina	1,77E-07
Doxorubicina	3,00E-07	Mitomicina C	9,00E-07	Topotecano	4,37E-07
Irinotecano	1,80E-05	Etopósido	2,89E-06	Dacarbazina	6,30E-04
Temsirolimus	5,00E-05	ET-743	2,00E-09	PM02734	1,76E-06
PM00104	2,00E-09				

b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor SK-MEL-2 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

5 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio, verificou-se que na linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-2:

10 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 42) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25, 50/50 e 30/70.

b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 43), PM01183 com citarabina (Figura 44), e PM01183 com metotrexato (Figura 45) exibiu sinergismo forte.

15 c. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 46) e PM01183 com doxorrubicina (Figura 47) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com mitomicina C (Figura 48) exibiu sinergismo forte.

20 d. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 49), PM01183 com irinotecano (Figura 50), e PM01183 com etopósido (Figura 51) exibiu sinergismo e até mesmo sinergismo forte em algumas razões de dose.

e. A combinação de PM01183 com dacarbazina mostrou sinergismo (Figura 52).

25 f. As combinações de PM01183 com temsirolimus mostrou sinergismo forte (Figura 53).

g. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 54) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

h. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 55) mostrou sinergismo nas razões de dose 25/75-50/50.

30 i. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 56) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose.

EXEMPLO 4. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma de próstata humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de próstata.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: 5 cisplatina, oxaliplatina, mitomicina C (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, vinorelbina, daunorrubicina, citarabina, doxorubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, metotrexato, etopósido, vorinostat, temsirolimus, bortezomibe, erlotinibe, flutamida, PM02734, 10 ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

PC-3 foi a linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano 15 selecionada para esse ensaio. As células PC-3 foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no 20 exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor PC-3.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente 25 individual para a linhagem celular de tumor PC-3 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,60E-09	Cisplatina	1,10E-04	Oxaliplatina	1,71E-04
5-FU	1,00E-03	Citarabina	4,00E-05	Gemcitabina	4,00E-07
Metotrexato	1,20E-04	Docetaxel	1,86E-08	Paclitaxel	9,00E-08
Vinorelbina	1,00E-05	Daunorrubicina	1,15E-06	Doxorrubicina	1,48E-06
Mitomicina C	1,00E-05	Actinomicina D	1,00E-08	Topotecano	6,33E-07
Irinotecano	7,00E-05	Etopósido	4,80E-05	Bortezomibe	8,00E-07
Vorinostat	3,90E-06	Flutamida	4,90E-05	Temsirolimus	5,00E-07

Erlotinibe	2,33E-04	ET-743	8,00E-09	PM02734	5,40E-07
PM00104	7,10E-09				

- b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano PC-3 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.
- 5 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme divulgado nos Exemplos 1.
- De acordo com esse ensaio verificou-se que em linhagem celular de câncer de próstata humano PC-3:
- 10 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 57) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com oxaliplatina (Figura 58) exibiu sinergismo forte.
- b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 59) e PM01183 com citarabina (Figura 60) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose,
- 15 e a combinação de PM01183 com gemcitabina exibiu sinergismo forte (Figura 61). Finalmente, a combinação de PM01183 com metotrexato mostrou sinergismo (Figura 62) nas razões de dose 30/70-25/75.
- c. A combinação de PM01183 com docetaxel mostrou sinergismo (Figura 63) em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com paclitaxel (Figura 64) mostrou sinergismo nas razões de dose 40/60-30/70. A combinação de PM01183 com vinorelbina (Figura 65) mostrou sinergismo forte.
- 20 d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 66) e PM01183 com doxorubicina (Figura 67) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com mitomicina C (Figura 68) e PM01183 com actinomicina D (Figura 69) mostrou
- 25 sinergismo em quase todas as razões de dose.
- e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 70) e PM01183 com irinotecano (Figura 71) exibiu sinergismo forte, enquanto que a combinação de PM01183 com etopósido (Figura 72) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- 30 f. A combinação de PM01183 com bortezomibe (Figura 73) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- g. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 74) mostrou sinergismo.

h. A combinação de PM01183 com flutamida (Figura 75) mostrou sinergismo nas razões de dose 40/60-25/75.

i. A combinação de PM01183 com temsirolimus exibiu sinergismo forte (Figura 76).

5 j. A combinação de PM01183 com erlotinibe (Figura 77) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

k. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 78) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

10 l. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 79) mostrou sinergismo nas razões de dose 75/25-70/30 e 30/70.

m. A combinação de PM01183 com PM00104 exibiu sinergismo forte (Figura 80).

15 **EXEMPLO 5.** Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma de pâncreas humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de carcinoma pancreático.

20 Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), gemcitabina, daunorrubicina, citarabina, doxorrubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, metotrexato, etopósido, vorinostat, temsirolimus, bortezomibe, erlotinibe, PM02734, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados
25 em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

30 PANC-1 foi a linhagem de carcinoma pancreático humano selecionada para esse ensaio. As células PANC-1 foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor PANC-1.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor PANC-1 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 5.

Tabela 5: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,80E-09	Cisplatina	1,47E-04	Oxaliplatina	1,84E-04
Citarabina	9,00E-05	Gemcitabina	1,00E-06	Metotrexato	1,00E-05
Daunorrubicina	8,69E-07	Doxorrubicina	3,45E-06	Actinomicina D	2,20E-08
Topotecano	4,37E-06	Irinotecano	9,00E-05	Etopósido	1,00E-05
Bortezomibe	4,16E-07	Vorinostat	6,05E-06	Temsirolimus	1,00E-05
Erlotinibe	4,16E-07	ET-743	2,10E-08	PM02734	9,00E-06
PM00104	7,89E-09				

b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano PANC-1 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme divulgado no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio verificou-se que in linhagem celular de carcinoma de pâncreas humano PANC-1:

a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 81) e PM01183 com oxaliplatina (Figura 82) exibiu sinergismo forte.

b. A combinação de PM01183 com citarabina (Figura 83) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com gemcitabina (Figura 84) e PM01183 com metotrexato (Figura 85) exibiu sinergismo forte.

c. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 86) e PM01183 com doxorubicina (Figura 87) exibiu sinergismo, enquanto que a combinação de PM01183 com actinomicina D (Figura 88) mostrou sinergismo nas razões de dose 75/25 e 30/70-25/75.

- d. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 89) e PM01183 com irinotecano (Figura 90) exibiu sinergismo forte, enquanto que a combinação de PM01183 com etopósido (Figura 91) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- 5 e. A combinação de PM01183 com bortezomibe (Figura 92) mostrou sinergismo nas razões de dose 75/25-70/30 e 50/50.
- f. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 93) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- g. A combinação de PM01183 com temsirolimus exibiu sinergismo forte
10 (Figura 94).
- h. A combinação de PM01183 com erlotinibe exibiu sinergismo forte (Figura 95).
- i. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 96) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- 15 j. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 97) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- k. A combinação de PM01183 com PM00104 mostrou sinergismo (Figura 98) nas razões de dose 75/25 e 50/50.

EXEMPLO 6. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em
20 combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma gástrico humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer gástrico.

25 Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, paclitaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, dacarbazina, citarabina, doxorrubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano,
30 metotrexato, etopósido, vorinostat, temsirolimus, bortezomibe, erlotinibe, apilidina, PM02734, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

35 HGC-27 foi a linhagem celular de carcinoma gástrico humano selecionada para esse ensaio. As células HGC-27 foram mantidas em meio Dulbeco

modificado por Iscove (IDMD) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

5 A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor HGC-27.

10 Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para linhagem celular de tumor HGC-27 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	8,50E-10	Cisplatina	8,00E-05	Oxaliplatina	1,06E-04
5-FU	1,00E-05	Citarabina	5,00E-05	Gemcitabina	5,34E-10
Metotrexato	3,30E-08	Paclitaxel	5,00E-09	Vincristina	1,25E-08
Vinorelbina	6,50E-08	Daunorrubicina	3,72E-07	Doxorrubicina	5,40E-08
Actinomicina D	3,74E-09	Topotecano	8,08E-07	Irinotecano	4,00E-06
Etopósido	2,90E-06	Bortezomibe	5,60E-09	Vorinostat	1,20E-06
Ciclofosfamida	1,00E-03	Dacarbazina	3,46E-04	Temsirolimus	1,50E-07
Erlotinibe	7,50E-06	Aplidina	9,00E-09	ET-743	5,80E-09
PM02734	9,50E-07	PM00104	3,20E-09		

15 b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano HGC-27 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

Cultura celular e foram desempenhados, conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT, conforme descrito no exemplo 1.

20 De acordo com esse ensaio verificou-se que in linhagem celular de carcinoma gástrico humano HGC-27:

a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 99) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com oxaliplatina (Figura 100) exibiu sinergismo forte.

- b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 101) e PM01183 com citarabina (Figura 102) exibiu sinergismo, mesmo sendo forte em algumas razões de dose. A combinação de PM01183 com gemcitabina (Figura 103) e PM01183 com metotrexato (Figura 104) mostrou sinergismo em quase todas as
5 razões de dose.
- c. A combinação de PM01183 com paclitaxel exibiu sinergismo forte (Figura 105). A combinação de PM01183 com vincristina (Figura 106) e PM01183 com vinorelbina (Figura 107) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- 10 d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 108) e PM01183 com actinomicina D (Figura 110) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com doxorrubicina (Figura 109) exibiu sinergismo nas razões de dose de 75/25-60/40.
- e. A combinação de PM01183 com topotecano exibiu sinergismo forte
15 (Figura 111). A combinação de PM01183 com irinotecano (Figura 112) mostrou sinergismo nas razões de dose de 70/30-60/40 e 40/60, enquanto que a combinação de PM01183 com etopósido (Figura 113) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- f. A combinação de PM01183 com bortezomibe exibiu sinergismo forte
20 (Figura 114).
- g. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 115) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- h. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida exibiu sinergismo forte (Figura 116).
- 25 i. A combinação de PM01183 com dacarbazina exibiu sinergismo forte (Figura 117).
- j. A combinação de PM01183 com temsirolimus exibiu sinergismo forte (Figura 118).
- k. A combinação de PM01183 com erlotinibe exibiu sinergismo forte (Figura
30 119).
- l. A combinação de PM01183 com aplidina mostrou sinergismo forte (Figura 120).
- m. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 121) mostrou sinergismo nas razões de dose de 50/50 e 75/25.
- 35 n. A combinação de PM01183 com PM02734 exibiu sinergismo forte (Figura 122).

o. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 123) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

EXEMPLO 7. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma ovariano humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de ovário.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida, carmustina, mitomicina C (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, dacarbazina, citarabina, doxorubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, metotrexato, etopósido, vorinostat, temsirolimus, erlotinibe, aplidina, PM02734, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

IGROV-1 foi a linhagem celular de adenocarcinoma ovariano humano selecionada para esse ensaio. As células IGROV-1 foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor IGROV-1.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor IGROV-1 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	3,20E-09	Cisplatina	7,00E-05	Oxaliplatina	8,50E-06
5-FU	9,00E-05	Citarabina	1,17E-05	Gemcitabina	6,34E-09

Metotrexato	1,00E-04	Docetaxel	5,01E-08	Paclitaxel	9,50E-08
Vincristina	3,79E-07	Vinorelbina	1,39E-06	Daunorrubicina	3,55E-07
Doxorrubicina	2,59E-07	Actinomicina D	3,29E-09	Mitomicina C	3,00E-06
Topotecano	3,00E-07	Irinotecano	1,00E-05	Etopósido	3,06E-06
Vorinostat	2,88E-06	Carmustina	7,12E-04	Ciclofosfamida	1,00E-03
Dacarbazina	3,98E-04	Temsirolimus	1,27E-07	Erlotinibe	7,91E-06
Aplidina	1,50E-09	ET-743	6,45E-09	PM02734	3,33E-07
PM00104	3,30E-09				

b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano IGROV-1 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

5 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio verificou-se que in linhagem celular de carcinoma ovariano humano IGROV-1:

10 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 124) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com oxaliplatina exibiu sinergismo forte (Figura 125).

15 b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 126) e PM01183 com citarabina (Figura 127) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose. A combinação de PM01183 com gemcitabina (Figura 128) e PM01183 com metotrexato (Figura 129) exibiu sinergismo.

20 c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 130), PM01183 com paclitaxel (Figura 131), e PM01183 com vincristina (Figura 132) exibiu sinergismo forte, enquanto que a combinação de PM01183 com vinorelbina (Figura 133) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

25 d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 134) exibiu sinergismo. A combinação de PM01183 com doxorrubicina (Figura 135) e PM01183 com actinomicina D (Figura 136) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com mitomicina C (Figura 137) mostrou sinergismo nas razões de dose de 50/50 e 30/70-25/75.

e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 138), PM01183 com irinotecano (Figura 139), e PM01183 com etopósido (Figura 140) exibiu sinergismo.

5 f. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 141) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

g. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 142) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

h. A combinação de PM01183 com carmustina (Figura 143) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose.

10 i. A combinação de PM01183 com dacarbazina (Figura 144) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

j. A combinação de PM01183 com temsirolimus exibiu sinergismo (Figura 145).

15 k. A combinação de PM01183 com erlotinibe exibiu sinergismo (Figura 146).

l. A combinação de PM01183 com aplidina (Figura 147) mostrou sinergismo nas razões de dose de 70/30-60/40.

m. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 148) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-60/40.

20 n. A combinação de PM01183 com PM02734 exibiu sinergismo forte (Figura 149).

o. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 150) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

25 **EXEMPLO 8.** Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer hepatocelular.

30 Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, citarabina, doxorubicina, topotecano, irinotecano, metotrexato, 35 etopósido, bortezomibe, erlotinibe, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em

série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Aliquotas de 50 μ L de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

5 HepG2 foi a linhagem celular de carcinoma de fígado hepatocelular humano selecionada para esse ensaio. As células de HepG2 foram mantidas em meio Essencial Mínimo de Eagle (MEME) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

10 A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor HepG2.

15 Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor HepG2 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 8.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC₅₀ (M)	Composto	IC₅₀ (M)	Composto	IC₅₀ (M)
PM01183	2,50E-09	Cisplatina	5,00E-05	Oxaliplatina	2,80E-05
5-FU	4,50E-06	Citarabina	2,06E-05	Gemcitabina	5,34E-09
Metotrexato	3,96E-08	Docetaxel	5,00E-07	Paclitaxel	5,70E-08
Vincristina	6,00E-08	Vinorelbina	1,02E-06	Daunorrubicina	3,00E-07
Doxorrubicina	2,00E-07	Topotecano	1,00E-06	Irinotecano	1,00E-06
Etopósido	1,04E-05	Bortezomibe	3,90E-07	Ciclofosfamida	1,00E-03
Erlotinibe	8,60E-06	ET-743	7,21E-09	PM00104	3,00E-09

20 b. Em um segundo conjunto de ensaios, HepG2 células de tumor humano foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

25 De acordo com esse ensaio verificou-se que em linhagem celular hepatocelular humana HepG2:

- a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 151) e PM01183 com oxaliplatina (Figura 152) exibiu sinergismo forte.
- b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 153) mostrou sinergismo nas razões de dose 75/25, 50/50 e 30/70. A combinação de PM01183 com citarabina (Figura 154), PM01183 com gemcitabina (Figura 155) e PM01183 com metotrexato (Figura 156) exibiu sinergismo forte.
- c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 157) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com paclitaxel (Figura 158) e PM01183 com vincristina (Figura 159) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com vinorelbina (Figura 160) mostrou sinergismo nas razões de dose de 50/50 e 30/70-25/75.
- d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 161) e PM01183 com doxorubicina (Figura 162) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 163) e PM01183 com etopósido (Figura 165) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com irinotecano (Figura 164) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- f. A combinação de PM01183 com bortezomibe (Figura 166) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-60/40.
- g. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 167) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- h. A combinação de PM01183 com erlotinibe (Figura 168) exibiu sinergismo forte.
- i. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 169) mostrou sinergismo nas razões de dose 60/40-50/50.
- j. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 170) exibiu sinergismo forte.

EXEMPLO 9. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma de mama humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de mama.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida, carmustina, mitomicina C (soluções

- estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, dacarbazina, citarabina, doxorubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, metotrexato, etopósido, vorinostat,
- 5 temsirolimus, erlotinibe, tamoxifeno, PM02734, ET-743 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de $50\ \mu\text{L}$ de cada composto diluído foram adicionadas por poço.
- 10 MDA-MB-231 foi a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano selecionada para esse ensaio. As células MDA-MB-231 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C , 5% de CO_2 e 95% de umidade.
- 15 A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:
- a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC_{50} foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor MDA-MB-231.
- 20 Os valores de IC_{50} (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor MDA-MB-231 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Valores de IC_{50} em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC_{50} (M)	Composto	IC_{50} (M)	Composto	IC_{50} (M)
PM01183	3,50E-09	Cisplatina	1,53E-04	Oxaliplatina	1,08E-04
5-FU	9,00E-05	Citarabina	9,57E-06	Gemcitabina	8,50E-09
Metotrexato	5,94E-06	Docetaxel	2,50E-09	Paclitaxel	8,50E-09
Vincristina	5,00E-08	Vinorelbina	1,20E-05	Daunorrubicina	3,70E-07
Doxorrubicina	6,00E-07	Actinomicina D	4,54E-10	Mitomomicina C	2,00E-06
Topotecano	1,66E-07	Irinotecano	8,50E-06	Etopósido	4,80E-06
Vorinostat	1,70E-06	Ciclofosfamida	1,00E-03	Carmustina	9,00E-04
Dacarbazina	1,92E-05	Tamoxifeno	1,30E-05	Temsirolimus	1,20E-05
Erlotinibe	1,00E-04	ET-743	2,00E-09	PM02734	2,80E-06
PM00104	1,00E-09				

b. Em um segundo conjunto de ensaios, células de tumor humano MDA-MB-231 foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

5 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio verificou-se que in linhagem celular de carcinoma de mama humano MDA-MB-231:

10 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 171) e PM01183 com oxaliplatina (Figura 172) exibiu sinergismo.

 b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 173) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose. A combinação de PM01183 com citarabina (Figura 174) e PM01183 com gemcitabina (Figura 175) exibiu
15 sinergismo forte, enquanto que a combinação de PM01183 com metotrexato (Figura 176) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-70/30 e 50/50.

 c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 177) e PM01183 com paclitaxel (Figura 178) exibiu sinergismo. A combinação de PM01183 com vincristina (Figura 179) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25 e 50/50,
20 enquanto que a combinação de PM01183 com vinorelbina (Figura 180) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

 d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 181) e PM01183 com mitomicina C (Figura 184) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose. A combinação de PM01183 com doxorubicina (Figura 182) exibiu
25 sinergismo forte e a combinação de PM01183 com actinomicina D (Figura 183) exibiu sinergismo.

 e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 185) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose. A combinação de PM01183 com irinotecano (Figura 186) e PM01183 com etopósido (Figura 187) exibiu
30 sinergismo.

 f. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 188) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25 e 50/50-40/60.

 g. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 189) exibiu sinergismo forte.

35 h. A combinação de PM01183 com carmustina (Figura 190) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose.

- i. A combinação de PM01183 com dacarbazina (Figura 191) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.
- j. A combinação de PM01183 com tamoxifeno (Figura 192) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose
- 5 k. A combinação de PM01183 com temsirolimus exibiu sinergismo forte (Figura 193).
- l. A combinação de PM01183 com erlotinibe exibiu sinergismo forte (Figura 194).
- 10 m. A combinação de PM01183 com ET-743 exibiu sinergismo forte (Figura 195).
- n. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 196) exibiu sinergismo em quase todas as razões de dose.
- o. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 197) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

15 **EXEMPLO 10.** Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagem celular de carcinoma colorretal humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer colorretal.

20

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida, mitomicina C (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, docetaxel, vinorelbina, daunorrubicina, dacarbazina, citarabina, doxorubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, etopósido, vorinostat, bortezomibe, temsirolimus, erlotinibe, PM02734 e aplidina (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

25

30

HT-29 foi a linhagem de adenocarcinoma de cólon humano selecionada para esse ensaio. As células HT-29 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

35

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

5 a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC_{50} foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor HT-29.

Os valores de IC_{50} (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor HT-29 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 10.

10 Tabela 10: Valores de IC_{50} em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC_{50} (M)	Composto	IC_{50} (M)	Composto	IC_{50} (M)
PM01183	3,70E-09	Cisplatina	2,20E-04	Oxaliplatina	1,03E-04
5-FU	9,00E-06	Citarabina	7,80E-06	Gemcitabina	4,00E-07
Docetaxel	3,20E-10	Vinorelbina	3,00E-08	Daunorrubicina	5,32E-07
Doxorrubicina	9,00E-07	Actinomicina D	3,27E-09	Mitomicina C	2,00E-06
Topotecano	3,28E-07	Irinotecano	9,00E-06	Etopósido	5,44E-06
Bortezomibe	6,15E-09	Vorinostat	2,76E-06	Ciclofosfamida	1,00E-03
Dacarbazina	2,47E-05	Temsirolimus	3,50E-06	Erlotinibe	2,56E-05
Aplidina	1,76E-09	PM02734	2,14E-07		

b. Em um segundo conjunto de ensaios, HT-29 células de tumor humano foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC_{50} únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

15 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio verificou-se que em linhagem celular de carcinoma colorretal humano HT-29:

20 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 198) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-70/30, enquanto que a combinação de PM01183 com oxaliplatina (Figura 199) exibiu sinergismo forte.

b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 200) e PM01183 com gemcitabina (Figura 202) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, e a combinação de PM01183 com citarabina (Figura 201) exibiu sinergismo forte.

c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 203) exibiu sinergismo nas razões de dose de 50/50 e 75/25, enquanto que a combinação de PM01183 com vinorelbina (Figura 204) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

5 d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 205) e PM01183 com mitomicina C (Figura 208) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com doxorubicina (Figura 206) e PM01183 com actinomicina D (Figura 207) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

10 e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 209) e PM01183 com etopósido (Figura 211) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com irinotecano (Figura 210) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

f. A combinação de PM01183 com bortezomibe (Figura 212) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

15 g. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 213) exibiu sinergismo.

h. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 214) mostrou sinergismo nas razões de dose de 40/60-25/75.

20 i. A combinação de PM01183 com dacarbazina (Figura 215) exibiu sinergismo forte.

j. A combinação de PM01183 com temsirolimus exibiu sinergismo forte (Figura 216).

k. A combinação de PM01183 com erlotinibe mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose (Figura 217).

25 l. A combinação de PM01183 com aplidina (Figura 218) mostrou sinergismo nas razões de dose de 40/60-25/75.

m. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 219) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

30 **EXEMPLO 11.** Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de carcinoma de rim humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer renal.

35 Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, ciclofosfamida, mitomicina C (soluções estoque desses compostos

preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, metotrexato, docetaxel, vincristina, vinorelbina, daunorrubicina, dacarbazina, citarabina, doxorrubicina, actinomicina D, topotecano, irinotecano, etopósido, vorinostat, erlotinibe, PM02734, ET-743, 5 PM00104 e aplidina (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Aliquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

RXF-393 foi a linhagem celular de carcinoma de rim humano selecionada para esse ensaio. As células RXF-393 foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. 10

A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1: 15

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor RXF-393.

Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor RXF-393 foram calculados através do uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 11. 20

Tabela 11: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	5,00E-09	Cisplatina	6,67E-05	5-FU	3,00E-04
Citarabina	5,00E-05	Gemcitabina	5,00E-07	Metotrexato	1,75E-04
Docetaxel	5,94E-10	Vincristina	1,73E-08	Vinorelbina	8,50E-06
Daunorrubicina	6,20E-07	Doxorrubicina	8,00E-07	Actinomicina D	7,09E-10
Mitomicina C	9,00E-06	Topotecano	3,93E-07	Irinotecano	1,40E-05
Etopósido	2,00E-05	Vorinostat	4,10E-06	Ciclofosfamida	1,00E-03
Dacarbazina	7,94E-04	Erlotinibe	4,80E-06	Aplidina	1,50E-09
ET-743	9,60E-09	PM02734	5,00E-06	PM00104	5,40E-09

b. Em um segundo conjunto de ensaios, RXF-393 células de tumor humano foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes 25

mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

5 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi medido pelo Ensaio de MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio verificou-se que em linhagem celular de carcinoma de rim humano RXF-393:

10 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 220) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 221), PM01183 com citarabina (Figura 222), PM01183 com gemcitabina (Figura 223), e PM01183 com metotrexato (Figura 224) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

15 c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 225), PM01183 com vincristina (Figura 226) e PM01183 com vinorelbina (Figura 227) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 228) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose. A combinação de PM01183 com doxorubicina (Figura 229) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-60/40, enquanto que a combinação de PM01183 com actinomicina D (Figura 230) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-70/30 e 30/70. A combinação de PM01183 com mitomicina C (Figura 231) exibiu sinergismo forte.

25 e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 232) exibiu sinergismo forte. A combinação de PM01183 com irinotecano (Figura 233) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com etopósido (Figura 234) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25 e 40/60-30/70.

f. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 235) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

30 g. A combinação de PM01183 com ciclofosfamida (Figura 236) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25-70/30 e 25/75.

h. A combinação de PM01183 com dacarbazina (Figura 237) mostrou sinergismo nas razões de dose 60/40-50/50.

35 i. A combinação de PM01183 com erlotinibe exibiu sinergismo forte (Figura 238).

j. A combinação de PM01183 com aplidina (Figura 239) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

k. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 240) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

5 l. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 241) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

m. A combinação de PM01183 com PM00104 (Figura 242) exibiu sinergismo forte.

10 **EXEMPLO 12.** Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de glioblastoma humano.

O objetivo desse estudo era determinar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de glioblastoma.

15 Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: cisplatina, oxaliplatina (soluções estoque desses compostos preparados em água duplamente destilada estéril e armazenadas em -20°C), 5-fluorouracil, gemcitabina, docetaxel, vincristina, daunorrubicina, dacarbazina, doxorubicina, topotecano, irinotecano, metotrexato, etopósido, vorinostat, temsirolimus,
20 bortezomibe erlotinibe, PM02734, ET-743 e aplidina (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

25 U87-MG foi a linhagem celular de glioblastoma humano selecionada para esse ensaio. As células U87-MG foram mantidas em meio Essencial Mínimo de Eagle (MEME) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

30 A triagem foi desempenhada em duas partes conforme divulgado no exemplo 1:

a. No primeiro conjunto de ensaios, valores de IC₅₀ foram determinados para cada droga após 72 horas de exposição à droga na linhagem celular de tumor U87-MG.

35 Os valores de IC₅₀ (72 horas de exposição à droga) de cada agente individual para a linhagem celular de tumor U87-MG foram calculados através do

uso da mesma metodologia divulgada no exemplo 1 e são mostrados na tabela 12.

Tabela 12: Valores de IC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente

Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)	Composto	IC ₅₀ (M)
PM01183	4,50E-09	Cisplatina	4,40E-05	Oxaliplatina	1,90E-04
5-FU	1,00E-03	Gemcitabina	4,50E-07	Metotrexato	5,00E-05
Docetaxel	1,00E-07	Vincristina	1,00E-07	Daunorrubicina	2,84E-07
Doxorrubicina	3,00E-07	Topotecano	7,50E-07	Irinotecano	7,54E-06
Etopósido	1,85E-05	Bortezomibe	4,00E-07	Vorinostat	1,60E-05
Dacarbazina	7,00E-04	Temsirolimus	3,50E-06	Erlotinibe	1,49E-04
Aplidina	3,80E-09	ET-743	5,00E-09	PM02734	4,08E-06

5 b. Em um segundo conjunto de ensaios, U87-MG células de tumor humano foram incubadas com PM01183 em combinação com cada um dos agentes mencionados acima na mesma combinação de concentrações de IC₅₀ únicas como aquelas descritas no exemplo 1.

10 Cultura celular e plaqueamento celular foram desempenhados conforme descrito anteriormente e o efeito citotóxico foi também medido pelo Ensaio MTT conforme descrito no exemplo 1.

De acordo com esse ensaio verificou-se que em linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG:

15 a. A combinação de PM01183 com cisplatina (Figura 243) mostrou sinergismo nas razões de dose 70/30 e 50/50, enquanto que a combinação de PM01183 com oxaliplatina (Figura 244) exibiu sinergismo forte.

b. A combinação de PM01183 com 5-fluorouracil (Figura 245) e PM01183 com metotrexato (Figura 247) exibiu sinergismo. A combinação de PM01183 com gemcitabina (Figura 246) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

20 c. A combinação de PM01183 com docetaxel (Figura 248) e PM01183 com vincristina (Figura 249) exibiu sinergismo forte.

d. A combinação de PM01183 com daunorrubicina (Figura 250) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose, enquanto que a combinação de PM01183 com doxorubicina (Figura 251) mostrou sinergismo nas razões de dose de 75/25 e 60/40.

25 e. A combinação de PM01183 com topotecano (Figura 252) e PM01183 com etopósido (Figura 254) mostrou sinergismo forte. A combinação de PM01183

com irinotecano (Figura 253) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

f. A combinação de PM01183 com bortezomibe (Figura 255) mostrou sinergismo em quase todas as razões de dose.

5 g. A combinação de PM01183 com vorinostat (Figura 256) exibiu sinergismo forte.

h. A combinação de PM01183 com dacarbazina (Figura 257) exibiu sinergismo.

10 i. A combinação de PM01183 com temsirolimus (Figura 258) mostrou sinergismo nas razões de dose de 50/50 e 30/70.

j. A combinação de PM01183 com erlotinibe (Figura 259) mostrou sinergismo nas razões de dose de 40/60-25/75.

k. A combinação de PM01183 com aplidina (Figura 260) mostrou sinergismo nas razões de dose 50/50-25/75.

15 m. A combinação de PM01183 com ET-743 (Figura 261) exibiu sinergismo forte.

l. A combinação de PM01183 com PM02734 (Figura 262) mostrou sinergismo forte.

20 **EXEMPLO 13.** Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com paclitaxel, vinorelbina e doxorubicina em xenoinxertos de tumor de ovário humano.

O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de paclitaxel, vinorelbina e doxorubicina através do uso de um modelo de xenoinxerto de carcinoma de ovário humano.

25 Camundongos nus atímicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais
30 foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi linhagem celular A2780, que foi obtida a partir da European Collection of Cell Cultures (ECACC - Coleção Europeia de Culturas Celulares nº 93112519).

35 Células A2780 foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em meio RPMI-1640. cada animal foi implantado de modo subcutâneo no flanco direito, utilizando

agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 1×10^7 células A2780 (a partir de passagem 5 *in vitro* em PM01183 e doxorubicina e estudos de vinorelbina e PM01183; e passagem 9 em estudo de paclitaxel e PM01183), em 0,05 ml de suspensão de 50% de Matrigel e 50% de meio livre de soro, sem antibióticos.

5 Medições de tumor foram determinadas através do uso de calibrador digital (Fowler Sylvac, S235PAT). A fórmula para calcular o volume para um elipsoide prolato foi utilizado para estimar o volume do tumor (mm^3) a partir de medições de tumor bidimensionais: Volume do tumor (mm^3) = $[L \times W^2] \div 2$, onde L é o comprimento e é o diâmetro mais longo em mm, e W é a largura e é o diâmetro
10 mais curto em mm de um tumor. Assumindo a densidade de unidade, o volume foi convertido em peso (ou seja, $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$). O volume do tumor e pesos corporais do animal foram medidos 2-3 vezes por semana iniciando desde o primeiro dia de tratamento (Dia 0).

 A tolerabilidade ao tratamento foi avaliada através do monitoramento da
15 evolução do peso corporal, sinais clínicos bem como evidências de dano local no local da injeção.

 Quando os tumores alcançaram um volume de cerca de 195 mm^3 no estudo de PM01183 com paclitaxel, um volume de cerca de 158 mm^3 no estudo de PM01183 com vinorelbina e um volume de cerca de $163,5 \text{ mm}^3$ no estudo de
20 PM01183 com doxorubicina, os camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de controle ($N = 5-7/\text{grupo}$) com base no peso corporal e medições de volume de tumor através do uso do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).

 PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado
25 que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Doxorubicina foi provida na forma de um pó sólido contendo Doxorubicina HCl, que foi reconstituída em 0,9% de solução salina. Vinorelbina foi provida como
30 uma solução preparada por diluição do produto com 0,9% de solução salina. Paclitaxel foi provido forma de uma solução preparada por diluição do produto com 5% de solução de glicose para injeção à concentração final alvo.

 Nesses experimentos, tratamentos com PM01183 e paclitaxel, PM01183 e vinorelbina e PM01183 e doxorubicina, bem como placebo, foram administrados
35 de modo intravenoso uma vez por semana até 2 semanas consecutivas nos Dias

0 e 7. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

A comparação do volume de tumor médio nos grupos de tratamento (T) ao volume de tumor médio no grupo de controle (T/C x 100%) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização foi determinada quando a resposta do grupo de combinação foi maior que a melhor resposta do agente mais ativo administrado como agente único (monoterapia) no mesmo cronograma e dose que aqueles utilizados na terapia de combinação.

Finalmente, o índice de combinação (CI), que mede quantitativamente o grau de interações de droga, foi obtido a partir das frações afetadas pelo tratamento, Fa (definido como $1 - T/C$) para cada grupo experimental no último dia de medição (Dia 10 para Estudo de combinação de PM01183 e paclitaxel, e Estudo de PM01183 e doxorrubicina, e Dia 9 para estudo de PM01183 e vinorelbina) utilizando o princípio de efeito médio (Chou T.C. Pharmacol. Rev. 2006, 58, 621-681).

A Tabela 13 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e paclitaxel, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 263 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores A2780 em camundongos tratados com placebo, PM01183, paclitaxel, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 13

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia				
			0	3	5	7	10
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	101,6	68,9	83,1	69,1	52,8
G03	0,135 mg/kg	PM01183	101,2	89,9	99,8	84,5	61,2
G04	0,09 mg/kg	PM01183	94,2	88,5	114,1	103,3	88,0
G05	0,045 mg/kg	PM01183	94,0	91,1	99,6	88,0	73,1
G06	25 mg/kg	Paclitaxel	95,3	49,3	42,9	34,0	19,8
G07	18,75 mg/kg	Paclitaxel	95,0	60,4	43,2	41,5	31,1
G08	12,5 mg/kg	Paclitaxel	96,2	62,5	73,9	62,5	50,8
G09	6,25 mg/kg	Paclitaxel	94,3	60,2	79,7	81,3	59,2

G10	0,18 mg/kg 25 mg/kg	PM01183 Paclitaxel	93,3	45,9	28,8	20,9	9,2
G11	0,135 mg/kg 18,75 mg/kg	PM01183 Paclitaxel	93,4	40,5	37,1	36,0	22,6
G12	0,09 mg/kg 12,5 mg/kg	PM01183 Paclitaxel	96,5	64,3	67,7	73,2	49,0
G13	0,045 mg/kg 6,25 mg/kg	PM01183 Paclitaxel	96,2	78,6	89,1	91,1	77,2

Placebo: bolo liofilizado contendo 100 mg de Sacarose + Fosfato de dihidrogênio de potássio 6,8 mg + Ácido fosfórico q.s. pH 3,8-4,5, que foi reconstituído com 1 ml de água por infusão.

- 5 A Tabela 14 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e vinorelbina, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 264 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores A2780 em camundongos tratados com placebo, PM01183, vinorelbina, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

10

Tabela 14

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia				
			0	2	5	7	9
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	98,9	101,6	72,2	61,3	62,8
G03	0,135 mg/kg	PM01183	98,3	105,3	77,2	79,1	78,7
G04	0,09 mg/kg	PM01183	98,0	88,6	61,2	87,6	94,5
G05	0,045 mg/kg	PM01183	97,8	107,5	93,6	92,5	97,1
G06	16,0 mg/kg	Vinorelbina	99,0	62,5	20,8	24,5	20,0
G07	12,0 mg/kg	Vinorelbina	97,4	67,2	39,1	43,0	36,1
G08	8,0 mg/kg	Vinorelbina	97,6	79,5	45,0	54,2	47,9
G09	4,0 mg/kg	Vinorelbina	97,2	88,6	69,3	81,7	77,3
G10	0,18 mg/kg 16,0 mg/kg	PM01183 Vinorelbina	97,3	50,1	10,9	10,6	8,6
G11	0,135 mg/kg	PM01183	97,2	74,0	29,6	31,2	26,8

	12,0 mg/kg	Vinorelbina					
G12	0,09 mg/kg 8,0 mg/kg	PM01183 Vinorelbina	96,8	69,3	48,3	56,5	49,8
G13	0,045 mg/kg 4,0 mg/kg	PM01183 Vinorelbina	97,1	85,6	61,7	74,2	81,6

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

5 Tabela 15 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e doxorubicina, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 265 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores A2780 em camundongos tratados com placebo, PM01183, doxorubicina, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 15

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia				
			0	3	5	7	10
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	100,9	70,2	68,5	69,3	62,1
G03	0,135 mg/kg	PM01183	102,2	82,4	86,6	89,2	82,4
G04	0,09 mg/kg	PM01183	100,2	93,3	95,2	93,5	87,7
G05	0,045 mg/kg	PM01183	100,1	98,2	98,6	97,7	90,0
G06	8,0 mg/kg	Doxorubicina	99,5	60,8	49,8	48,1	39,4
G07	6,0 mg/kg	Doxorubicina	99,4	71,0	60,3	56,8	54,3
G08	4,0 mg/kg	Doxorubicina	102,0	82,9	75,1	75,0	68,9
G09	2,0 mg/kg	Doxorubicina	99,8	91,5	93,1	94,2	86,2
G10	0,18 mg/kg 8,0 mg/kg	PM01183 Doxorubicina	99,7	47,6	32,6	30,3	21,1
G11	0,135 mg/kg 6,0 mg/kg	PM01183 Doxorubicina	100,6	67,0	54,9	53,9	44,9
G12	0,09 mg/kg 4,0 mg/kg	PM01183 Doxorubicina	98,3	74,7	69,0	63,1	64,4
G13	0,045 mg/kg 2,0 mg/kg	PM01183 Doxorubicina	98,1	83,1	86,6	78,1	79,2

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

De acordo com esses ensaios verificou-se que:

a. O tratamento de combinação de PM01183 e paclitaxel foi efetivo na inibição do crescimento das células ovarianas A2780, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 9,2% e 22,6% (Dia 10) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e paclitaxel produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (paclitaxel em doses de 25 mg/kg e 18,75 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (25 mg/kg de paclitaxel + 0,18 mg/kg de PM01183) vs paclitaxel isolado (25 mg/kg de paclitaxel) foram 28,8 vs 42,9 (dia 5), 20,9 vs 34,0 (dia 7), e 9,2 vs 19,8 (dia 10), e os valores TC (%) da combinação (18,75 mg/kg de paclitaxel + 0,135 mg/kg de PM01183) vs paclitaxel isolado (18,75 mg/kg de paclitaxel) foram 37,1 vs 43,2 (dia 5), 36,0 vs 41,5 (dia 7), e 22,6 vs 31,1 (dia 10). Portanto, quando PM01183 está em combinação com paclitaxel, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e paclitaxel resultou em valores CI menores que 1 (em Fa maior que 0,8), indicando sinergismo em camundongos portando tumores xenoenxertados A2780 ovarianos.

b. O tratamento de combinação de PM01183 e vinorelbina foi efetivo na inibição do crescimento das células ovarianas A2780, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 8,6% e 26,8% (Dia 9) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e vinorelbina produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (vinorelbina em doses de 16 mg/kg e 12 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (16 mg/kg de vinorelbina + 0,18 mg/kg de PM01183) vs vinorelbina isolada (16 mg/kg de vinorelbina) foram 10,9 vs 20,8 (dia 5), 10,6 vs 24,5 (dia 7), e 8,6 vs 20,0 (dia 9), e os valores TC (%) da combinação (12 mg/kg de vinorelbina + 0,135 mg/kg de PM01183) vs vinorelbina isolada (12 mg/kg de vinorelbina) foram 29,6 vs 39,1 (dia 5), 31,2 vs 43 (dia 7), e 26,8 vs 36,1 (dia 9). Portanto, quando PM01183 está em combinação com vinorelbina, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e vinorelbina resultou em valores CI de 0,75 (em Fa igual a 0,97),

indicando sinergismo em camundongos portando tumores xenoenxertados A2780 ovarianos.

5 c. O tratamento de combinação de PM01183 e doxorubicina foi efetivo na inibição do crescimento das células ovarianas A2780, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 21,1% e 44,9% (Dia 10) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e doxorubicina produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (doxorubicina em uma dose de 8 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da
10 combinação (8 mg/kg de doxorubicina + 0,18 mg/kg de PM01183) vs doxorubicina isolada (8 mg/kg de doxorubicina) foram 32,6 vs 49,8 (dia 5), 30,3 vs 48,1 (dia 7), e 21,1 vs 39,4 (dia 10). Portanto, quando PM01183 está em combinação com doxorubicina, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

15 Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e doxorubicina resultou em valores CI menores que 1 (em Fa maior que 0,8), indicando sinergismo em camundongos portando tumores xenoenxertados A2780 ovarianos.

20 **EXEMPLO 14.** Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com cisplatina e 5-fluorouracil em xenoenxertos de tumor gástrico humano.

O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar uma atividade antitumoral de cisplatina e 5-fluorouracil através do uso de um modelo de xenoenxerto de carcinoma gástrico humano.

25 Camundongos nus atímicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais
30 foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi linhagem celular HGC-27, que foi obtida a partir da European Collection of Cell Cultures (ECACC - Coleção Europeia de Culturas Celulares nº 94042256).

35 As células HGC-27 foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em meio Dulbecco modificado por Iscove (IDMD). Cada animal foi implantado de modo

subcutâneo no flanco direito, utilizando agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 5×10^6 células HGC-27 (a partir da passagem 4 *in vitro* em estudo de PM01183 e cisplatina, e passagem 6 em Estudo de PM01183 e 5-fluorouracil), em 0,05 ml de suspensão de 50% de Matrigel e 50% de meio livre de soro, sem antibióticos.

5 Medições de tumor e tolerabilidade ao tratamento foram desempenhadas e determinadas conforme descrito no exemplo 13.

Quando os tumores alcançaram um volume de cerca de $165,5 \text{ mm}^3$ no estudo de PM01183 com cisplatina e um volume de cerca de 170 mm^3 no estudo de PM01183 com 5-fluorouracil, os camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de controle ($N = 5-7/\text{grupo}$) com base no peso corporal e medições de volume de tumor através do uso do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).

PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Cisplatina e 5-fluorouracil foram providos às soluções preparadas por diluição do produto com 0,9% de solução salina para injeção à concentração final alvo.

Nesses experimentos, tratamentos com PM01183 e cisplatina e PM01183 e 5-fluorouracil, bem como placebo, foram administrados de modo intravenoso uma vez por semana até 2 semanas consecutivas nos Dias 0 e 7. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

Comparação do volume de tumor médio nos grupos de tratamento (T) ao volume de tumor médio no grupo de controle (T/C x 100%) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização e o índice de combinação (CI) foram determinados conforme descrito no exemplo 13.

A Tabela 16 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e cisplatina, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 266 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores HGC-27 em camundongos tratados com placebo, PM01183, cisplatina, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 16

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia						
			0	3	5	7	10	12	14
G01	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-	-

(Grupo de controle)									
G02	0,18 mg/kg	PM01183	99,6	65,9	55,6	38,7	33,5	24,3	24,3
G03	0,135 mg/kg	PM01183	97,9	71,6	59,9	47,8	39,3	37,1	38,3
G04	0,09 mg/kg	PM01183	98,6	67,5	67,9	66,1	70,2	60,3	65,0
G05	0,045 mg/kg	PM01183	98,9	85,9	83,1	92,1	76,4	81,6	88,5
G06	6,0 mg/kg	Cisplatina	97,7	76,1	79,0	75,1	64,4	61,3	72,7
G07	4,5 mg/kg	Cisplatina	98,5	90,5	94,5	90,2	75,7	73,7	81,1
G08	3,0 mg/kg	Cisplatina	99,0	78,6	80,0	78,7	81,3	82,8	85,1
G09	1,5 mg/kg	Cisplatina	99,3	78,1	78,8	82,6	83,5	86,6	89,9
G10	0,18 mg/kg 6,0 mg/kg	PM01183 Cisplatina	95,7	55,0	42,4	22,3	12,9	7,6	4,6
G11	0,135 mg/kg 4,5 mg/kg	PM01183 Cisplatina	99,2	67,7	42,7	28,6	17,3	12,1	9,8
G12	0,09 mg/kg 3,0 mg/kg	PM01183 Cisplatina	99,9	80,0	64,3	45,7	47,2	42,4	56,7
G13	0,045 mg/kg 1,5 mg/kg	PM01183 Cisplatina	99,9	93,3	83,0	75,9	69,3	70,3	80,0

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

5 A Tabela 17 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e 5-fluorouracil, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 267 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores HGC-27 em camundongos tratados com placebo, PM01183, 5-fluorouracil, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 17

	T/C % no dia
--	--------------

Grupo	Dose	Materiais de teste	0	2	5	7	9	12	14
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	99,6	78,6	50,9	43,3	41,0	33,0	29,2
G03	0,135 mg/kg	PM01183	100,2	81,5	58,7	61,4	60,2	54,6	55,1
G04	0,09 mg/kg	PM01183	100,6	90,5	87,6	83,4	82,6	76,7	67,7
G05	0,045 mg/kg	PM01183	99,9	84,3	103,2	104,6	103,5	101,6	85,0
G06	50,0 mg/kg	5-Fluorouracil	100,3	81,2	82,3	81,1	75,6	69,6	60,7
G07	37,5 mg/kg	5-Fluorouracil	99,4	86,9	86,9	78,6	73,2	76,7	83,1
G08	25,0 mg/kg	5-Fluorouracil	100,6	89,8	97,0	111,4	102,6	93,9	82,8
G09	12,5 mg/kg	5-Fluorouracil	100,7	81,7	101,3	102,8	98,6	90,5	83,8
G10	0,18 mg/kg 50,0 mg/kg	PM01183 5-Fluorouracil	99,6	73,0	44,2	35,9	31,5	25,3	22,0
G11	0,135 mg/kg 37,5 mg/kg	PM01183 5-Fluorouracil	100,8	73,4	63,5	53,1	50,6	42,8	51,1
G12	0,09 mg/kg 25,0 mg/kg	PM01183 5-Fluorouracil	99,6	95,8	97,7	98,9	90,0	74,7	69,9
G13	0,045	PM01183	99,5	80,6	87,3	88,5	99,3	87,1	84,2

	mg/kg	5-							
	12,5	Fluorouracil							
	mg/kg								

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

De acordo com esses ensaios verificou-se que:

a. O tratamento de combinação de PM01183 e cisplatina foi efetivo na inibição do crescimento das células gástricas HGC-27, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 4,6% e 9,8% (Dia 14) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e cisplatina produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (PM01183 em doses de 0,18 mg/kg e 0,135 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (6 mg/kg de cisplatina + 0,18 mg/kg de PM01183) vs PM01183 isolado (0,18 mg/kg de PM01183) foram 12,9 vs 33,5 (dia 10), 7,6 vs 24,3 (dia 12), e 4,6 vs 24,3 (dia 14), e os valores TC (%) da combinação (4,5 mg/kg de cisplatina + 0,135 mg/kg de PM01183) vs PM01183 isolado (0,135 mg/kg de PM01183) foram 17,3 vs 39,3 (dia 10), 12,1 vs 37,1 (dia 12), e 9,8 vs 38,3 (dia 14). Portanto, quando PM01183 está em combinação com paclitaxel, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e cisplatina resultou em valores CI menores que 1 (em Fa maior que 0.8), indicando sinergismo em camundongos portando tumores xenoenxertados HGC-27 gástricos.

b. O tratamento de combinação de PM01183 e 5-fluorouracil foi efetivo na inibição do crescimento das células gástricas HGC-27, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 22,0% e 51,1% (Dia 14) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e 5-fluorouracil produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (PM01183 em uma dose de 0,18 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (50 mg/kg 5-fluorouracil + 0,18 mg/kg de PM01183) vs PM01183 isolado (0,18 mg/kg de PM01183) foram 35,9 vs 43,3 (dia 7), 31,5 vs 41,0 (dia 9), 25,3 vs 33,0 (dia 12), e 22,0 vs 29,2 (dia 14). Portanto, quando PM01183 está em combinação com 5-fluorouracil, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e 5-fluorouracil resultou em valores CI de 0,78 (em Fa igual a 0,97), indicando sinergismo moderado em camundongos portando tumores xenoenxertados HGC-27 gástricos.

5 **EXEMPLO 15.** Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com gemcitabina em xenoenxertos de tumor pancreático humano.

O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de gemcitabina através do uso de um modelo de xenoenxerto de câncer pancreático humano.

10 Camundongos nus atímicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais
15 foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi a linhagem celular SW1990, que foi obtida a partir da American Type Culture Collection (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano: CRL-2172™).

20 As células SW1990 foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em meio RPMI-1640. Cada animal foi implantado de modo subcutâneo no flanco direito, utilizando agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 5x10⁶ células SW1990, a partir da passagem 12 *in vitro*, em 0,05 ml de suspensão de 50% de Matrigel e 50% de meio livre de soro, sem antibióticos.

25 Medições de tumor e tolerabilidade ao tratamento foram desempenhadas e determinadas conforme descrito no exemplo 13.

Quando os tumores alcançaram um volume de cerca de 210 mm³ os camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de controle (*N* = 5-7/grupo) com base no peso corporal e medições de volume de tumor através do uso do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).
30

PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Gemcitabina
35 foi provida como uma solução preparada através de reconstituição do produto com 0,9% de solução salina para injeção a uma concentração de 40 mg/ml de

solução estoque. A solução estoque de gemcitabina foi adicionalmente diluída com 0,9% de solução salina para injeção à concentração final alvo.

Nesses experimentos, tratamento com PM01183 e gemcitabina, bem como placebo, foram administrados de modo intravenoso uma vez por semana até 3
5 semanas consecutivas nos Dias 0, 7 e 14. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

A comparação do volume de tumor médio nos grupos de tratamento (T) ao volume de tumor médio no grupo de controle (T/C x 100%) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização e o índice de
10 combinação foram determinados conforme descrito no exemplo 13.

A Tabela 18 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e gemcitabina, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 268 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores SW1990 em camundongos tratados com placebo, PM01183, gemcitabina, e as
15 combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 18

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia					
			0	3	6	8	10	13
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	100,0	74,3	61,3	59,4	56,7	56,1
G03	0,135 mg/kg	PM01183	99,6	81,3	71,0	73,1	65,6	63,1
G04	0,09 mg/kg	PM01183	101,1	81,5	72,8	68,7	68,4	74,4
G05	0,045 mg/kg	PM01183	100,2	83,6	82,8	93,3	82,9	88,1
G06	180,0 mg/kg	Gemcitabina	102,2	84,1	73,9	66,1	60,9	59,4
G07	135,0mg/kg	Gemcitabina	102,3	78,3	71,9	63,7	55,4	52,7
G08	90,0 mg/kg	Gemcitabina	103,8	70,0	73,8	63,3	55,6	54,8
G09	45,0 mg/kg	Gemcitabina	102,3	85,5	70,3	70,5	63,3	64,8
G10	0,18 mg/kg 180,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	102,1	69,7	51,2	46,2	36,0	34,1
G11	0,135 mg/kg 135,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	100,4	64,6	52,8	51,5	48,9	46,0

G12	0,09 mg/kg 90,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	98,2	83,2	64,4	59,7	50,6	49,6
G13	0,045 mg/kg 45,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	97,7	81,6	70,9	68,8	65,9	65,7

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

Tabela 18 (Cont.)

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia					
			15	17	20	22	24	28
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	53,2	47,8	44,2	45,3	44,8	38,9
G03	0,135 mg/kg	PM01183	56,3	56,7	56,9	56,5	53,0	51,7
G04	0,09 mg/kg	PM01183	74,7	80,7	71,9	75,4	77,3	63,9
G05	0,045 mg/kg	PM01183	92,6	86,5	85,1	84,5	85,8	85,4
G06	180,0 mg/kg	Gemcitabina	58,5	52,1	49,1	48,6	46,9	39,3
G07	135,0mg/kg	Gemcitabina	54,8	51,2	49,5	48,7	49,8	49,5
G08	90,0 mg/kg	Gemcitabina	49,9	47,4	47,6	47,0	45,9	49,2
G09	45,0 mg/kg	Gemcitabina	63,1	58,5	58,7	57,3	65,2	59,3
G10	0,18 mg/kg 180,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	34,7	31,6	31,7	28,0	26,0	22,7
G11	0,135 mg/kg 135,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	42,4	38,2	36,6	34,6	31,5	25,8
G12	0,09 mg/kg 90,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	47,4	46,0	43,8	49,1	46,0	42,9
G13	0,045 mg/kg 45,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	57,9	59,9	55,9	54,9	52,1	50,5

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

De acordo com esse ensaio verificou-se que:

- 5 a. O tratamento de combinação de PM01183 e gemcitabina foi efetivo na inibição do crescimento das células pancreáticas SW 1990, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 22,7% e 25,8% (Dia 28) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e gemcitabina

produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (PM01183 em uma dose de 0,18 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (180 mg/kg de gemcitabina + 0,18 mg/kg de PM01183) vs PM01183 isolado (0,18 mg/kg de PM01183) foram 31,7 vs 44,2 (dia 20), 28,0 vs 45,3 (dia 22), 26,0 vs 44,8 (dia 24), e 22,7 vs 38,9 (dia 28). Portanto, quando PM01183 está em combinação com gemcitabina, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e gemcitabina resultou em valores CI menores que 1 (em Fa maior que 0.8), indicando sinergismo em camundongos portando tumores xenoenxertados SW 1990 pancreáticos.

EXEMPLO 16. Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com temozolomida em xenoenxertos de tumor cerebral humano.

O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de temozolomida através do uso de um modelo de xenoenxerto de tumor cerebral humano.

Camundongos nus atímicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi linhagem celular U87-MG, que foi obtida a partir da American Type Culture Collection (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano HTB-14™).

As células U87-MG foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEME). Cada animal foi implantado de modo subcutâneo no flanco direito, utilizando agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 5x10⁶ células U87-MG, a partir de passagem 5 *in vitro*, em 0,05 ml de suspensão de 50% de Matrigel e 50% de meio livre de soro, sem antibióticos.

Medições de tumor e tolerabilidade ao tratamento foram desempenhadas e determinadas conforme descrito no exemplo 13.

Quando os tumores alcançaram um volume de cerca de 139 mm³, os camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de

controle ($N = 5-7/\text{grupo}$) com base no peso corporal e medições de volume de tumor através do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).

PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Temozolomida foi provida como uma solução preparada por diluição do produto em DMSO 10% em 0,9% de solução salina para injeção à concentração final alvo.

Nesses experimentos, tratamentos com PM01183 e temozolomida, bem como placebo, foram administrados conforme segue: PM01183, de modo intravenoso, uma vez por semana até 3 semanas consecutivas, nos Dias 0, 7 e 14, temozolomida oralmente, diariamente durante 8 dias consecutivos (Dias 0 a 7), e placebo foi administrado seguindo o mesmo cronograma que aqueles providos para PM01183 e temozolomida. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

A comparação do volume de tumor médio nos grupos de tratamento (T) ao volume de tumor médio no grupo de controle ($T/C \times 100\%$) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização e o índice de combinação (CI) foram determinados conforme descrito no exemplo 13.

A Tabela 19 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e temozolomida, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 269 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores U87-MG em camundongos tratados com placebo, PM01183, temozolomida, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 19

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia							
			0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	99,8	95,5	64,8	63,2	52,0	44,1	38,5	37,1

G03	0,135 mg/kg	PM01183	98,5	90,5	61,2	71,3	67,7	65,3	64,2	63,6
G04	0,09 mg/kg	PM01183	97,9	99,5	74,4	85,1	69,4	71,8	74,1	73,5
G05	0,045 mg/kg	PM01183	98,2	101,0	80,4	83,8	78,8	77,7	76,7	82,5
G06	3,0 mg/kg	Temozolomida	97,1	95,5	67,3	39,4	25,3	22,9	28,4	31,5
G07	1,5 mg/kg	Temozolomida	94,1	96,9	75,6	73,0	56,5	59,3	50,0	53,5
G08	1,0 mg/kg	Temozolomida	98,2	100,2	65,1	81,2	55,0	63,5	73,1	75,0
G09	0,75 mg/kg	Temozolomida	97,7	98,9	76,3	77,3	64,4	63,1	62,8	72,7
G10	0,18 mg/kg 3,0 mg/kg	PM01183 Temozolomida	97,8	95,0	50,9	33,1	21,0	18,3	16,6	17,4
G11	0,135 mg/kg 1,5 mg/kg	PM01183 Temozolomida	98,7	102,4	62,7	42,0	30,3	29,1	29,0	30,9
G12	0,09 mg/kg 1,0 mg/kg	PM01183 Temozolomida	96,2	101,0	79,3	76,1	49,8	51,2	57,6	56,5
G13	0,045 mg/kg 0,75 mg/kg	PM01183 Temozolomida	101	106,0	67,4	73,0	57,8	59,0	69,3	72,2

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

De acordo com esse ensaio verificou-se que:

- a. O tratamento de combinação de PM01183 e temozolomida foi efetivo na inibição do crescimento das células de tumor cerebral U87-MG, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao

grupo de controle com valores T/C de 17,4% e 30,9% (Dia 16) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e temozolomida produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (temozolomida em doses de 3 mg/kg e 1,5 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (3 mg/kg de temozolomida + 0,18 mg/kg de PM01183) vs temozolomida isolada (3 mg/kg de temozolomida) foram 18,3 vs 22,9 (dia 11), 16,6 vs 28,4 (dia 14), e 17,4 vs 31,5 (dia 16), e os valores TC (%) da combinação (1,5 mg/kg de temozolomida + 0,135 mg/kg de PM01183) vs temozolomida isolada (1,5 mg/kg de temozolomida) foram 29,1 vs 59,3 (dia 11), 29,0 vs 50,0 (dia 14), e 30,9 vs 53,5 (dia 16). Portanto, quando PM01183 está em combinação com temozolomida, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e temozolomida resultou em valores CI menores que 1 (em Fa maior que 0,8), indicando sinergismo em camundongos portando tumores xenoenxertados U87-MG cerebral.

EXEMPLO 17. Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com irinotecano em xenoenxertos de tumor pulmonar humano.

O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de irinotecano através do uso de um modelo de xenoenxerto de câncer de pulmão humano.

Camundongos nus atômicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi linhagem celular H460, que foi obtida a partir da American Type Culture Collection of Cell Cultures (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano ref. HTB-177TM).

As células H460 foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Cada animal foi implantado de modo subcutâneo no flanco direito, utilizando agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 5x10⁶ células H460, a partir de passagem 10 *in vitro*, em 0,05 ml de suspensão de 50% de Matrigel e 50% de meio livre de soro, sem antibióticos.

Medições de tumor e tolerabilidade ao tratamento foram desempenhadas e determinadas conforme descrito no exemplo 13.

Quando os tumores alcançaram um volume de cerca de 177 mm³, os camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de controle ($N = 5-7/\text{grupo}$) com base no peso corporal e medições de volume de tumor através do uso do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).

PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Irinotecano foi provido na forma de uma solução preparada por diluição do produto com 5% de solução de glicose para injeção à concentração final alvo.

Nesses experimentos, tratamentos com PM01183 e irinotecano, bem como placebo, foram administrados de modo intravenoso conforme segue: PM01183 uma vez por semana até 2 semanas consecutivas, nos Dias 0 e 7, irinotecano foi dosado a cada 4 dias, nos Dias 0, 4 e 8, e placebo foi administrado seguindo o mesmo cronograma que aqueles providos para PM01183 e irinotecano. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

A comparação do volume de tumor médio nos grupos de tratamento (T) ao volume de tumor médio no grupo de controle ($T/C \times 100\%$) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização e o índice de combinação (CI) foram determinados conforme descrito no exemplo 13.

Tabela 20 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e irinotecano, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 270 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores H460 em camundongos tratados com placebo, PM01183, irinotecano, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 20

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia					
			0	2	5	7	9	12
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	114,4	79,6	74,7	75,0	69,1	64,9

G03	0,135 mg/kg	PM01183	117,6	77,4	67,5	71,7	66,7	52,9
G04	0,09 mg/kg	PM01183	116,9	83,1	83,9	76,9	80,6	84,9
G05	0,045 mg/kg	PM01183	108,3	78,7	61,2	67,2	78,8	87,9
G06	50,0 mg/kg	Irinotecano	112,1	54,9	34,7	27,5	24,8	22,9
G07	37,5 mg/kg	Irinotecano	114,9	51,9	44,0	36,7	35,6	37,0
G08	25,0 mg/kg	Irinotecano	112,0	55,6	54,9	49,6	53,1	51,8
G09	12,5 mg/kg	Irinotecano	97,5	50,3	44,4	48,6	50,0	51,5
G10	0,18 mg/kg 50,0 mg/kg	PM01183 Irinotecano	117,1	44,3	19,4	13,4	10,9	9,0
G11	0,135 mg/kg 37,5 mg/kg	PM01183 Irinotecano	111,2	51,7	23,8	18,4	15,7	15,3
G12	0,09 mg/kg 25,0 mg/kg	PM01183 Irinotecano	110,0	53,2	38,1	26,6	28,0	27,1
G13	0,045 mg/kg 12,5 mg/kg	PM01183 Irinotecano	109,0	60,4	60,1	56,5	60,0	58,5

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

De acordo com esse ensaio verificou-se que:

- a. O tratamento de combinação de PM01183 e irinotecano foi efetivo na inibição do crescimento das células pulmonares H460, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 9,0% e 15,3% (Dia 12) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e irinotecano produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (irinotecano em doses de 50 mg/kg e 37,5 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (50 mg/kg de irinotecano + 0,18 mg/kg de PM01183) vs irinotecano isolado (50 mg/kg de irinotecano) foram 19,4 vs 34,7 (dia 5), 13,4 vs 27,5 (dia 7), 10,9 vs 24,8 (dia 9), e 9,0 vs 22,9 (dia 12), e os valores TC (%) da combinação (37,5 mg/kg de irinotecano + 0,135 mg/kg de PM01183) vs irinotecano isolado (37,5 mg/kg de irinotecano) foram 23,8 vs 44,0 (dia 5), 18,4 vs 36,7 (dia 7), 15,7 vs 35,6 (dia 9), e 15,3 vs 37,0 (dia 12). Portanto, quando PM01183 está em combinação com irinotecano, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e irinotecano resultou em valores CI menores que 1 (em Fa maior que

0.8), indicando sinergismo ou sinergismo forte em camundongos portando tumores xenoenxertados H460 de pulmão.

EXEMPLO 18. Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com dacarbazina em xenoenxertos de fibrossarcoma humano.

5 O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de temozolomida através do uso de um modelo de xenoenxerto de fibrossarcoma humano.

10 Camundongos nus atômicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

15 O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi linhagem celular HT1080, que foi obtida a partir da American Type Culture Collection (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano CCL-121™).

20 células HT1080 foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEME). Cada animal foi implantado ortotopicamente no músculo gastrocnêmio através de uma injeção intramuscular utilizando agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 5x10⁶ células HT1080, a partir de passagem 9 *in vitro*, suspensas em meio livre de soro, sem antibióticos.

25 As medições de diâmetro total (tumor + perna) foram determinadas através do uso de calibrador digital (Fowler Sylvac, S235PAT). Esse diâmetro total e pesos corporais do animal foram medidos 2-3 vezes por semana iniciando a partir do primeiro dia de tratamento.

Tolerabilidade ao tratamento foi avaliada através do monitoramento da evolução do peso corporal, sinais clínicos bem como evidências de dano local no local da injeção.

30 Quando o diâmetro total alcançou um comprimento de cerca de 11,3 mm, os camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de controle (*N* = 5-7/grupo) com base no peso corporal e medições de tumor através do uso do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).

35 PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de

glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Dacarbazina foi provida na forma de uma solução preparada por diluição do produto com 5% de solução de glicose para injeção à concentração final alvo.

5 Nesses experimentos, tratamentos com PM01183 e dacarbazina, bem como placebo, foram administrados de modo intravenoso uma vez por semana até 2 semanas consecutivas, nos Dias 0 e 7. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

10 A comparação do diâmetro total médio (tumor + perna) nos grupos de tratamento (T) ao diâmetro total médio (tumor + perna) no grupo de controle (T/C x 100%) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização e o índice de combinação (CI) foram determinados conforme descrito no exemplo 13.

15 A Tabela 21 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e dacarbazina, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 271 mostra a avaliação de diâmetro total (tumor + perna) de tumores HT1080 em camundongos tratados com placebo, PM01183, dacarbazina, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 21

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia							
			0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	100	59,3	40,0	26,9	26,7	11,5	21,2	30,6
G03	0,135 mg/kg	PM01183	100	63,0	62,9	48,1	36,0	30,2	33,0	41,9
G04	0,09 mg/kg	PM01183	100	66,7	57,1	65,4	48,0	42,7	45,8	56,4
G05	0,045 mg/kg	PM01183	100	77,8	74,3	94,2	80,0	74,0	80,5	91,1
G06	150,0	Dacarbazina	100	40,7	28,6	30,8	44,0	37,5	44,9	57,3

	mg/kg									
G07	112,5 mg/kg	Dacarbazina	100	48,1	34,3	53,8	48,0	37,5	43,2	53,2
G08	75,0 mg/kg	Dacarbazina	100	74,1	65,7	69,2	58,7	45,8	46,6	51,6
G09	37,5 mg/kg	Dacarbazina	100	51,8	54,3	65,4	61,3	47,9	55,1	62,1
G10	0,18 mg/kg 150,0 mg/kg	PM01183 Dacarbazina	100	37,0	22,9	17,3	4,0	10,4	-4,2	1,0
G11	0,135 mg/kg 112,5 mg/kg	PM01183 Dacarbazina	100	29,6	25,7	11,5	-8,0	- 17,7	-6,8	7,3
G12	0,09 mg/kg 75,0 mg/kg	PM01183 Dacarbazina	100	37,0	31,4	28,8	52,0	43,7	50,8	64,5
G13	0,045 mg/kg 37,5 mg/kg	PM01183 Dacarbazina	100	55,6	51,4	67,3	70,7	62,5	59,3	62,1

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

De acordo com esse ensaio verificou-se que:

- a. O tratamento de combinação de PM01183 e dacarbazina foi efetivo na inibição do crescimento das células de fibrossarcoma HT1080, resultando em uma redução estatisticamente ($P < 0,01$) do diâmetro total (tumor + perna) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 1,0% e 7,3% (Dia 16) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e dacarbazina produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (PM01183 em doses de 0,18 mg/kg e 0,135 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (150 mg/kg de dacarbazina + 0,18 mg/kg de PM01183) vs PM01183 isolado (0.18 mg/kg de PM01183) foram 4,0 vs 26,7 (dia 9), 10,4 vs 11,5 (dia 11), -4,2 vs 21,2 (dia 14), e 1,0 vs 30,6 (dia 16), e os valores

TC (%) da combinação (112,5 mg/kg de dacarbazina + 0,135 mg/kg de PM01183) vs PM01183 isolado (0,135 mg/kg de PM01183) foram -8,0 vs 36,0 (dia 9), -17,7 vs 30,2 (dia 11), -6,8 vs 33,0 (dia 14), e 7,3 vs 41,9 (dia 16). Portanto, quando PM01183 está em combinação com dacarbazina, uma potencialização da
5 atividade antitumoral é claramente observada.

Adicionalmente, com base no princípio de efeito médio, a combinação de PM01183 e dacarbazina resultou em valores CI de 0,28 (em Fa igual a 0,97), indicando sinergismo forte em tumores implantados ortotopicamente de fibrossarcoma HT1080 de camundongos.

10 **EXEMPLO 19.** Estudos *in vivo* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com irinotecano em xenoenxertos de tumor colorretal humano.

O objetivo desses estudos foi avaliar a capacidade de PM01183 de potencializar a atividade antitumoral de irinotecano através do uso de um modelo de xenoenxerto de carcinoma colorretal humano.

15 Camundongos nus atômicos (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Espanha) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas ventiladas, até dez por gaiola, em um ciclo de luz-escuro de 12 horas 21-23°C e 40-60% de umidade. Permitiu-se aos camundongos acesso livre à dieta de roedor padrão irradiada e água esterilizada. Os animais
20 foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes da implantação de tumor com uma suspensão de célula de tumor.

O modelo de tumor utilizado nesses estudos foi linhagem celular HT-29, que foi obtida a partir da American Type Culture Collection (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano ref. HTB-38TM).

25 As células HT-29 foram cultivadas em 37°C com 5% de CO₂ em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Cada animal foi implantado de modo subcutâneo no flanco direito, utilizando agulha 26G e uma seringa 1 cc, com 5x10⁶ células HT-29, a partir de passagem 10 *in vitro*, em 0,05 ml de 0,9% de Cloreto de Sódio para injeção.

30 Medições de tumor e tolerabilidade ao tratamento foram desempenhadas e determinadas conforme descrito no exemplo 13. A tolerabilidade ao tratamento foi avaliada através do monitoramento da evolução do peso corporal, sinais clínicos bem como evidências de dano local no local da injeção.

Quando os tumores alcançaram um volume de cerca de 180 mm³, os
35 camundongos foram aleatoriamente alocados nos tratamentos e grupos de

controle ($N = 5-7/\text{grupo}$) com base no peso corporal e medições de volume de tumor através do uso do Software NewLab Oncology (versão 2.25.06.00).

PM01183 foi provido na forma de frascos de bolo de PM01183 liofilizado que foi reconstituído com água por infusão a uma concentração de 0,2 mg/ml. A solução estoque de PM01183 foi adicionalmente diluída em 5% de solução de glicose para injeção nas concentrações de formulação de dosagem. Irinotecano foi provido na forma de uma solução preparada por diluição do produto com 5% de solução de glicose para injeção à concentração final alvo.

Nesses experimentos, tratamentos com PM01183 e irinotecano, bem como placebo, foram administrados de modo intravenoso conforme segue: PM01183 uma vez por semana até 3 semanas consecutivas, nos Dias 0, 7 e 14, irinotecano foi dosado a cada 4 dias, nos Dias 0, 4, 8, 12 e 16, e placebo foi administrado seguindo o mesmo cronograma que aqueles providos para PM01183 e irinotecano. Grupos de nível de dose foram administrados como agentes únicos ou em combinação.

Comparação do volume de tumor médio nos grupos de tratamento (T) ao volume de tumor médio no grupo de controle ($T/C \times 100\%$) foi utilizada para avaliação da eficácia antitumoral. Adicionalmente, a potencialização foi determinada conforme descrito no exemplo 13.

A Tabela 22 relata os valores T/C % obtidos com PM01183 e irinotecano, ambos administrados como agentes únicos e em combinação para cada nível de dose, e a Figura 272 mostra a avaliação de volume de tumor de tumores HT-29 em camundongos tratados com placebo, PM01183, irinotecano, e as combinações correspondentes para os grupos dosados nas duas razões mais altas.

Tabela 22

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia				
			0	3	5	7	10
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	100,4	108,4	86,5	101,1	116,5
G03	0,135 mg/kg	PM01183	98,4	106,4	95,3	116,6	115,2
G04	0,09 mg/kg	PM01183	98,4	100,9	88,7	121,9	129,8

G05	0,045 mg/kg	PM01183	99,8	103,7	100,6	111,1	135,8
G06	50,0 mg/kg	Irinotecano	100,1	114,7	93,7	96,1	70,5
G07	37,5 mg/kg	Irinotecano	98,4	108,1	97,5	99,2	84,3
G08	25,0 mg/kg	Irinotecano	98,8	108,6	97,2	101,4	96,5
G09	12,5 mg/kg	Irinotecano	99,0	99,1	90,6	97,4	92,7
G10	0,18 mg/kg 50,0 mg/kg	PM01183 Irinotecano	99,5	101,8	78,3	77,5	51,6
G11	0,135 mg/kg 37,5 mg/kg	PM01183 Irinotecano	98,4	98,0	85,2	85,4	60,7
G12	0,09 mg/kg 25,0 mg/kg	PM01183 Irinotecano	99,7	96,4	71,7	77,0	62,7
G13	0,045 mg/kg 12,5 mg/kg	PM01183 Irinotecano	100,7	104,8	104,3	116,0	98,8

Placebo: conforme descrito na tabela 13.

Tabela 22 (Cont.)

Grupo	Dose	Materiais de teste	T/C % no dia			
			12	14	17	20
G01 (Grupo de controle)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	115,4	123,4	86,7	77,5
G03	0,135 mg/kg	PM01183	119,1	121,5	133,1	105,2
G04	0,09 mg/kg	PM01183	114,1	109,4	116,1	93,4
G05	0,045 mg/kg	PM01183	125,1	109,3		
G06	50,0 mg/kg	Irinotecano	61,7	51,7	41,4	33,3
G07	37,5 mg/kg	Irinotecano	77,4	65,0	58,4	49,4
G08	25,0 mg/kg	Irinotecano	79,3	82,5	76,3	60,3
G09	12,5 mg/kg	Irinotecano	90,8	89,4	102,6	93,4
G10	0,18 mg/kg 50,0 mg/kg	PM01183 Irinotecano	43,8	30,4	21,7	15,6
G11	0,135 mg/kg	PM01183 Irinotecano	51,9	40,1	39,2	28,7

	37,5 mg/kg					
G12	0,09 mg/kg 25,0 mg/kg	PM01183 Irinotecano	57,7	50,1	47,2	40,7
G13	0,045 mg/kg 12,5 mg/kg	PM01183 Irinotecano	85,5	90,5	88,1	76,5

Placebo: conforme descrito na tabela 13

De acordo com esse ensaio verificou-se que:

- a. O tratamento de combinação de PM01183 e irinotecano foi efetivo na inibição do crescimento das células de tumor cerebral U87-MG, resultando em uma redução de tumor estatisticamente significativa ($P < 0,01$) em comparação ao grupo de controle com valores T/C de 15,6% e 28,7% (Dia 20) nos dois grupos altamente dosados. Além disso, a combinação de PM01183 e irinotecano produziu valores T/C menores que o agente mais ativo único nesse experimento (irinotecano em doses de 50 mg/kg e 37,5 mg/kg). Especialmente, os valores TC (%) da combinação (50 mg/kg de irinotecano + 0,18 mg/kg de PM01183) vs irinotecano isolado (50 mg/kg de irinotecano) foram 30,4 vs 51,7 (dia 14), 21,7 vs 41,4 (dia 17), e 15,6 vs 33,3 (dia 20), e os valores TC (%) da combinação (37,5 mg/kg de irinotecano + 0,135 mg/kg de PM01183) vs irinotecano isolado (37,5 mg/kg de irinotecano) foram 40,1 vs 65,0 (dia 14), 39,2 vs 58,4 (dia 17), e 28,7 vs 49,4 (dia 20). Portanto, quando PM01183 está em combinação com irinotecano, uma potencialização da atividade antitumoral é claramente observada.

EXEMPLO 20. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares de leucemia humana.

- Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183: metotrexato, daunorrubicina, aplidina, ET-743, PM02734 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

- JURKAT e MOLT-4 foram as linhagens celulares de leucemia humana selecionadas para esse ensaio, que foram obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano). As células JURKAT e MOLT-4 foram cultivadas em meio RPMI livre de vermelho de fenol suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100

unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes:

- 5 a. No primeiro conjunto de ensaios, a potência relativa de cada composto contra as diferentes linhagens celulares foi determinada utilizando um ensaio de citotoxicidade de 72 horas de exposição *in vitro*.

10 Brevemente, as células foram plantadas em placas para microtitulação com 96 poços em uma densidade de 50000 células por poço em 150 µL de meio de cultura e incubadas durante 4-6 horas em meio livre de droga antes do tratamento com veículo isolado ou compostos de teste durante 72 horas.

15 Após a incubação, o efeito citotóxico foi avaliado utilizando um ensaio de redução de MTT. 50 µL de solução de MTT (1 mg/ml) foram adicionados aos poços e incubados durante 15-17 horas em 37°C até que cristais de formazan fossem formados. Após remover gentilmente o meio de cultura, DMSO foi
20 adicionado para dissolver o produto de formazan púrpura insolúvel em uma solução colorida. A absorvância dos poços foi quantificada por medição da densidade óptica em 540 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de crescimento celular de controle. Os valores de EC₅₀ (meia-concentração efetiva máxima) utilizados para os estudos de comparação foram calculados
25 utilizando o software Prism v5.02 (GraphPad). EC₅₀ foi expressa como concentração molar e representou a média de pelo menos ensaios independentes.

Os valores de EC₅₀ individuais obtidos para cada droga são mostrados na tabelas 23 e 24.

- 25 Tabela 23: Valores de EC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente para linhagem celular de tumor JURKAT.

Composto	EC50 (M)	Composto	EC50 (M)	Composto	EC50 (M)
Metotrexato	1,45E-07	Daunorrubicina	7,92E-07	Aplidina	1,38E-08
ET-743	6,96E-09	PM00104	4,83E-09	PM01183	1,55E-09
PM02734	5,50E-06				

- Tabela 24: Valores de EC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente para a linhagem celular de tumor MoLT-4.

Composto	EC50 (M)	Composto	EC50 (M)	Composto	EC50 (M)

Metotrexato	4,39E-08	Aplidina	1,27E-09	ET-743	3,84E-09
PM00104	1,55E-09	PM01183	8,57E-10	PM02734	1,44E-05

b. Em um segundo conjunto de experimentos, as curvas de resposta de concentração para os agentes testados, tanto isoladamente quando em combinação de duas drogas, foram desempenhadas, utilizando a mesma metodologia descrita no parágrafo anterior.

5 Dadas as diferenças significativas entre os respectivos valores de EC50 para PM01183 e as outras drogas padrões nesse estudo, razões diferentes de concentrações fixas para as duas drogas foram utilizadas. Normalmente, a seleção das razões fixas de concentrações foi a razão equipotente (1:1) no valor de EC50 para cada droga, e algumas das outras razões representando diferentes
10 porcentagens de valores de EC50 correspondentes para cada droga acima ou abaixo a ela. Utilizando essas concentrações iniciais, diluições em série constantes foram desempenhadas para gerar as curvas de resposta de concentração para cada conjunto de drogas, isoladamente e em combinação.

O efeito da combinação de duas drogas, como em comparação com o
15 efeito de cada droga isolada, na viabilidade de células de tumor, foi avaliado utilizando o método de Chou e Talalay, que é com base no princípio de efeito médio (Chou e Talalay, Adv. Enzyme Regul. 1984, 22, 27-55). A equação de efeito médio: $f_a / f_u = (C / C_m)^m$ (onde C é a concentração de droga, C_m a concentração de efeito médio (ou seja, IC_{50} , ED50, ou LD50, que inibe o sistema sob estudo em 50%), f_a a fração celular afetada pela concentração de droga C, f_u
20 a fração não afetada, e m o coeficiente de sigmoidicidade da curva de resposta de concentração), descreve o relacionamento entre a concentração e o efeito de uma droga em um dado sistema biológico.

Com base nessa equação, o termo "índice de combinação" (CI) é utilizado
25 como uma medida quantitativa do grau de interações de droga. O índice de combinação (CI) é determinado pela equação:

$$CI = (C)_1 / (C_x)_1 + (C)_2 / (C_x)_2$$

onde $(C_x)_1$ é a concentração de droga 1 isolada que inibe uma porcentagem x de um sistema, $(C_x)_2$ a concentração de droga 2 isolada que inibe a mesma
30 porcentagem x do sistema, e $(C)_1 + (C)_2$ as concentrações de droga 1 e droga 2 que, em combinação, também inibe uma porcentagem X do sistema. Os valores CI foram calculados resolvendo-se a equação para diferentes valores de f_a (ou

seja, para diferentes graus de inibição de crescimento celular). Os valores CI de <1 indicam sinergia, o valor de 1 indica efeito aditivos, e valores >1 indicam antagonismo.

Os dados foram analisados utilizando o software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK). Para análise estatística e gráficos, o software Prism (GraphPad, San Diego, EUA) foi utilizado. Todos os resultados representam o meio de pelo menos três experimentos independentes.

O efeito das combinações de droga testadas na proliferação celular é mostrado nas Figuras 273-283:

10 - Combinação de PM01183 com metotrexato. A combinação de PM01183 com metotrexato em linhagem celular JURKAT (Figura 273) resultou em alguns efeitos sinérgicos (CI<1) em determinadas concentrações de ambas as drogas. Os efeitos de PM01183 em combinação com metotrexato em linhagem celular MOLT-4 (Figura 274) foram, na maioria, aditivos.

15 - Combinação de PM01183 com daunorrubicina. A combinação de PM01183 com daunorrubicina em linhagem celular JURKAT (Figura 275) foi aditiva ou sinérgica (CI<1) em determinadas concentrações dos compostos.

20 - Combinação de PM01183 com aplidina. As combinações de PM01183 com aplidina em linhagens celulares JURKAT (Figura 276) e MOLT-4 (Figura 277) resultaram em alguns efeitos sinérgicos (CI<1) em determinadas concentrações de ambas as drogas.

25 - Combinação de PM01183 com ET-743. A combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular JURKAT (Figura 278) foi aditiva ou sinérgica (CI<1) em determinadas concentrações de ambas as drogas. A combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular MOLT-4 (Figura 279) foi, na maioria, aditiva.

30 - Combinação de PM01183 com PM00104. A combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular JURKAT (Figura 280) foi pelo menos aditiva resultando em alguns efeitos sinérgicos (CI<1). A combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular MOLT-4 (Figura 281) resultou em efeitos sinérgicos (CI<1).

35 - Combinação de PM01183 com PM02734. A combinação de PM01183 com PM02734 em linhagem celular JURKAT (Figura 282) foi, na maioria, aditiva, resultando em alguns efeitos sinérgicos (CI<1) em determinadas concentrações de ambas as drogas. A combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular MOLT-4 (Figura 283) resultou em efeitos sinérgicos (CI<1).

EXEMPLO 21. Estudos *in vitro* para determinar o efeito de PM01183 em combinação com agentes quimioterápicos em linhagens celulares linfoma humano.

Os seguintes agentes foram avaliados em combinação com PM01183:
 5 gemcitabina, citarabina, metotrexato, daunorrubicina, ET-743, PM02734 e PM00104 (soluções estoque desses compostos preparados em DMSO puro e armazenados em -20°C). Diluições em série adicionais foram preparadas em meio de cultura livre de soro para obter uma concentração de 4X final. Alíquotas de 50 µL de cada composto diluído foram adicionadas por poço.

10 RAMOS e U-937 foram as linhagens celulares de linfoma humano selecionadas para esse ensaio, que foram obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC - Coleção de Cultura de Tipo Americano). As células RAMOS e U-937 foram cultivadas em meio RPMI livre de vermelho de fenol suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina e 100
 15 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina, em 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A triagem foi desempenhada em duas partes, conforme descrito anteriormente no exemplo 20.

No primeiro conjunto de ensaios, os valores de EC₅₀ individuais foram
 20 determinados para cada droga conforme mostrado nas tabelas 25 e 26.

Tabela 25: Valores de EC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente para a linhagem celular de tumor RAMOS.

Composto	EC ₅₀ (M)	Composto	EC ₅₀ (M)	Composto	EC ₅₀ (M)
Gemcitabina	2,51E-08	Citarabina	3,64E-08	Metotrexato	5,02E-06
Daunorrubicina	3,15E-07	ET-743	9,55E-09	PM00104	4,35E-09
PM01183	1,39E-09	PM02734	1,36E-05		

Tabela 26: Valores de EC₅₀ em concentração molar (M) para cada agente para a linhagem celular de tumor U-937.

Composto	EC ₅₀ (M)	Composto	EC ₅₀ (M)	Composto	EC ₅₀ (M)
Gemcitabina	3,27E-08	Metotrexato	2,63E-08	Daunorrubicina	3,04E-07
ET-743	8,62E-09	PM00104	4,50E-09	PM01183	1,03E-09
PM02734	6,85E-06				

25 No segundo conjunto de ensaios, curvas de resposta de concentração para os agentes testados, tanto isoladamente quanto em combinação de duas drogas,

foram desempenhadas Os efeitos das combinações de droga foram avaliadas utilizando o Método de Chou e Talalay conforme descrito no exemplo 20

O efeito das combinações de droga testadas na proliferação celular é mostrado nas Figuras 284-296:

5 - Combinação de PM01183 com citarabina. A combinação de PM01183 com citarabina em linhagem celular RAMOS (Figura 284) resultou em alguns efeitos sinérgicos ($CI < 1$).

 - Combinação de PM01183 com metotrexato. A combinação de PM01183 com metotrexato em linhagem celular RAMOS (Figura 285) resultou em alguns
10 efeitos sinérgicos ($CI < 1$) em determinadas concentrações de ambas as drogas. Os efeitos de PM01183 em combinação com metotrexato em linhagem celular U-937 (Figura 286) resultou em alguns efeitos sinérgicos em determinadas concentrações.

 - Combinação de PM01183 com gemcitabina. A combinação de PM01183
15 com gemcitabina em linhagem celular RAMOS (Figura 287) foi aditiva ou sinérgica ($CI < 1$) em determinadas concentrações de ambas as drogas. A combinação de PM01183 com gemcitabina em linhagem celular U-937 (Figura 288) resultou em efeitos sinérgicos ($CI < 1$).

 - Combinação de PM01183 com daunorrubicina. As combinações de
20 PM01183 com daunorrubicina em linhagens celulares RAMOS (Figura 289) e U-937 (Figura 290) foram pelo menos aditivas resultando em alguns efeitos sinérgicos ($CI < 1$).

 - Combinação de PM01183 com ET-743. As combinações de PM01183 com ET-743 em linhagens celulares RAMOS (Figura 291) e U-937 (Figura 292)
25 resultou em efeitos sinérgicos ($CI < 1$) em determinadas concentrações dos compostos.

 - Combinação de PM01183 com PM00104. A combinação de PM01183 com PM00104 em RAMOS (Figura 293) resultou em efeitos sinérgicos ($CI < 1$). A
30 combinação de PM01183 com PM00104 em linhagem celular U-937 (Figura 294) resultou em alguns efeitos sinérgicos ($CI < 1$) em determinadas concentrações de ambas as drogas.

 - Combinação de PM01183 com PM02734. A combinação de PM01183 com PM02734 em linhagem celular RAMOS (Figura 295) resultou em efeitos
35 sinérgicos ($CI < 1$), enquanto que a combinação de PM01183 com ET-743 em linhagem celular U-937 (Figura 296) foi pelo menos aditiva, resultando em alguns efeitos sinérgicos ($CI < 1$) em altas concentrações de ambas as drogas.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de PM01183 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em combinação sinérgica com um antimetabólito, **caracterizado** pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, em que o antimetabólito é selecionado a partir de 5-fluorouracil, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de melanoma maligno, carcinoma gástrico e câncer cerebral; gemcitabina, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, câncer de ovário, hepatoma e câncer de mama; citarabina, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de sarcoma, melanoma maligno, carcinoma gástrico, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal e linfoma; e metotrexato, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de melanoma maligno, carcinoma de pâncreas, câncer de ovário, hepatoma, câncer cerebral e linfoma.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e o antimetabólito formam parte do mesmo medicamento.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e o antimetabólito são fornecidos como medicamentos separados para administração ao mesmo tempo ou em tempos diferentes.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e o antimetabólito são fornecidos como medicamentos separados para administração em tempos diferentes.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o antimetabólito é selecionado a partir de 5-fluorouracil e o câncer a ser tratado é selecionado a partir de melanoma maligno, carcinoma gástrico e câncer cerebral.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o antimetabólito é gemcitabina, e o câncer a ser tratado é selecionado a partir de câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, câncer de ovário, hepatoma e câncer de mama.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o antimetabólito é citarabina, e o câncer a ser tratado é selecionado a partir de sarcoma, melanoma maligno, carcinoma gástrico, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal e linfoma.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o antimetabólito é metotrexato, e o câncer a ser tratado é selecionado a partir de melanoma maligno, carcinoma de pâncreas, câncer de ovário, hepatoma, câncer cerebral e linfoma.

9. Kit para uso no tratamento de câncer, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma forma de dosagem de PM01183, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e uma forma de dosagem de um antimetabólito selecionado a partir de 5-fluorouracil, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de melanoma maligno, carcinoma gástrico e câncer cerebral; gemcitabina, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de câncer de próstata, carcinoma de pâncreas, câncer de ovário, hepatoma e câncer de mama; citarabina, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de sarcoma, melanoma maligno, carcinoma gástrico, hepatoma, câncer de mama, câncer colorretal e linfoma; e metotrexato, quando o câncer a ser tratado é selecionado a partir de melanoma maligno, carcinoma de pâncreas, câncer de ovário, hepatoma, câncer cerebral e linfoma; e instruções para o uso de ambas as drogas em combinação sinérgica.

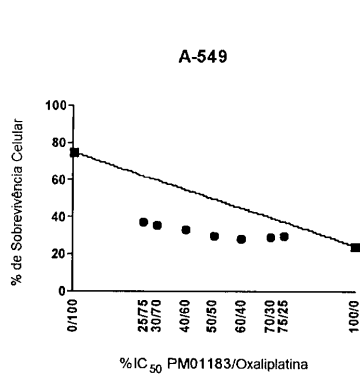


Figura 1

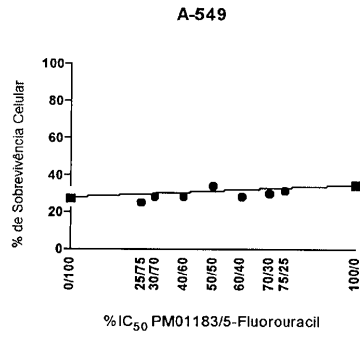


Figura 2

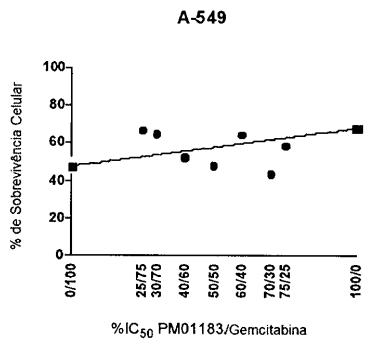


Figura 3

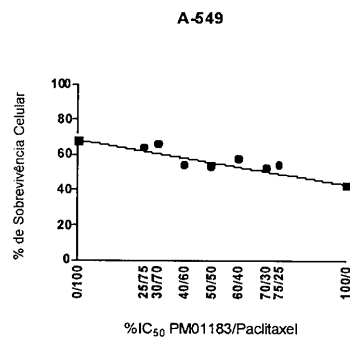


Figura 4

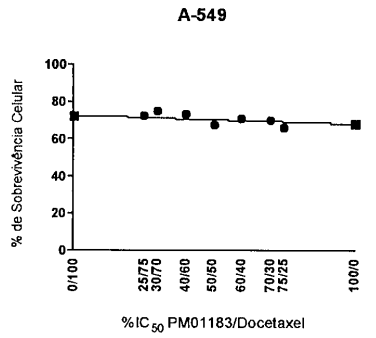


Figura 5

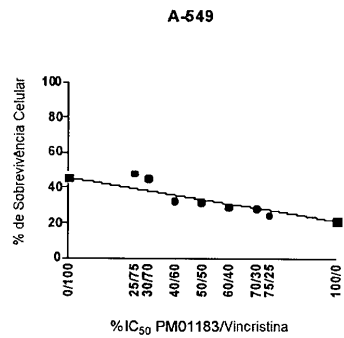


Figura 6

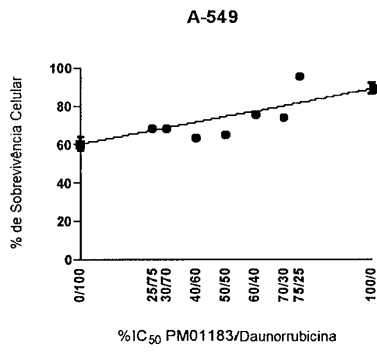


Figura 7

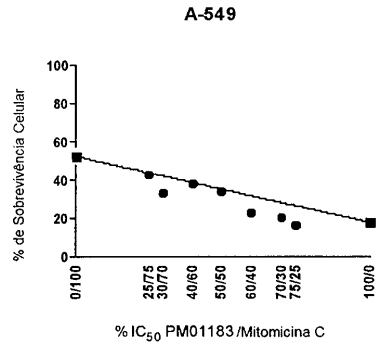


Figura 8

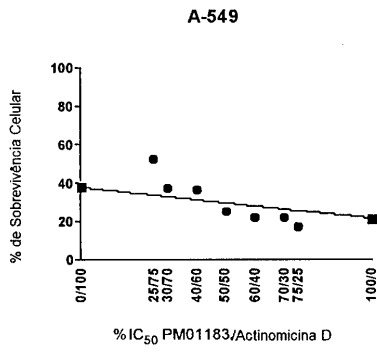


Figura 9

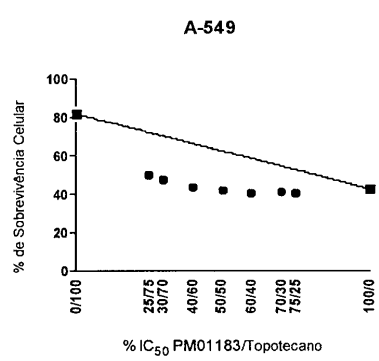


Figura 10

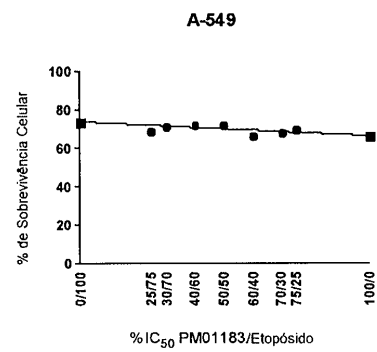


Figura 11

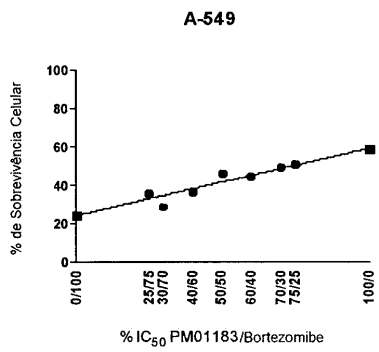


Figura 12

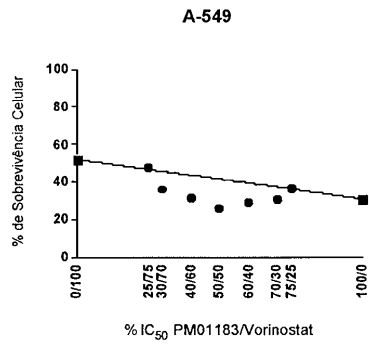


Figura 13

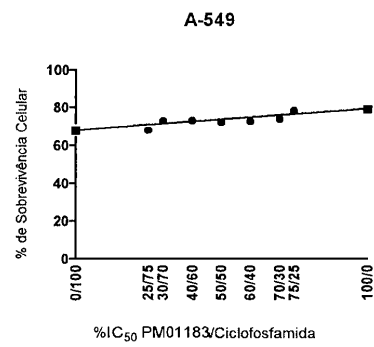


Figura 14

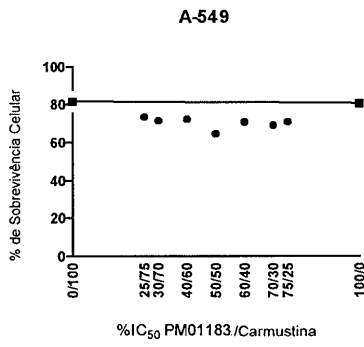


Figura 15

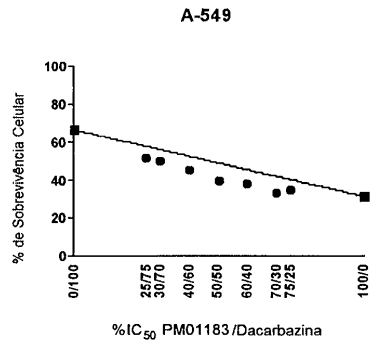


Figura 16

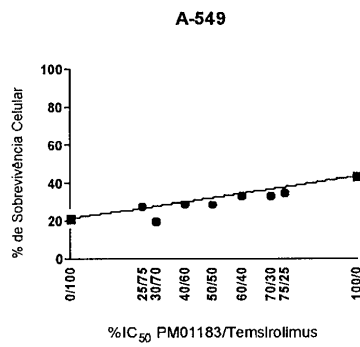


Figura 17

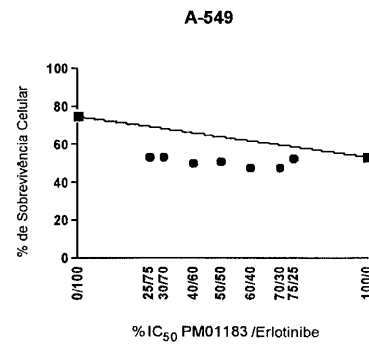


Figura 18

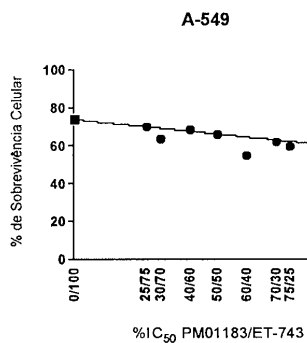


Figura 19

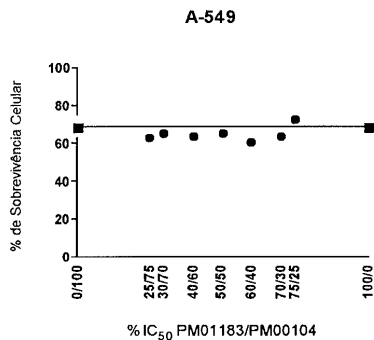


Figura 20

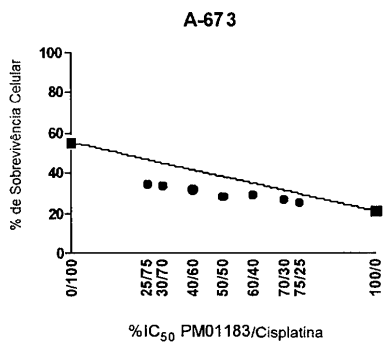


Figura 21

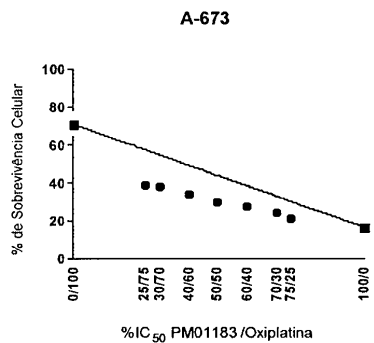


Figura 22

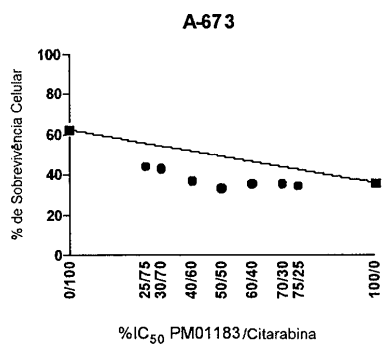


Figura 23

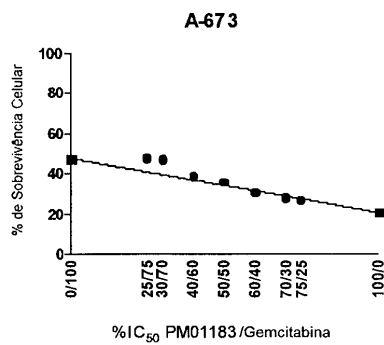


Figura 24

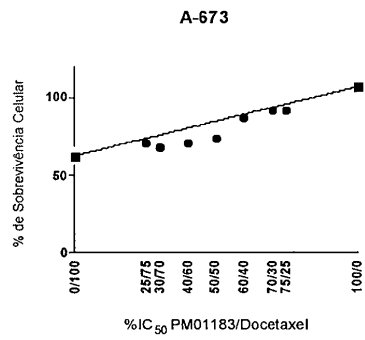


Figura 25

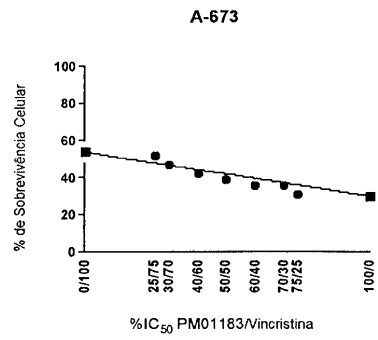


Figura 26

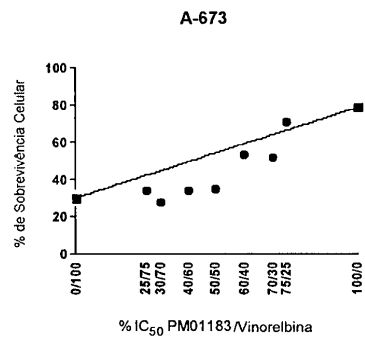


Figura 27

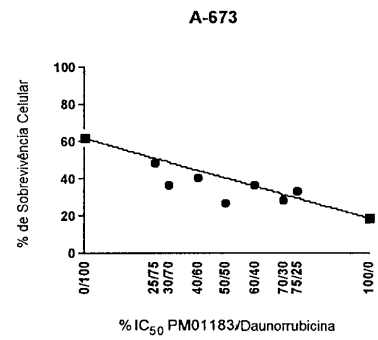


Figura 28

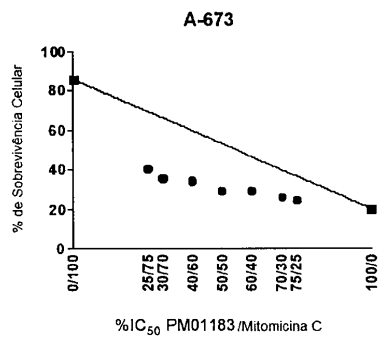


Figura 29

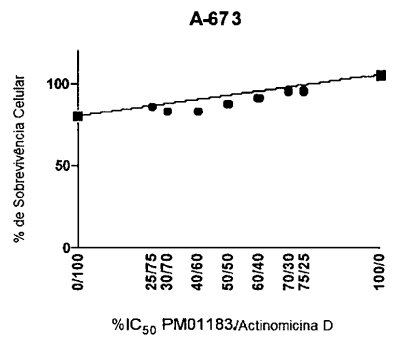


Figura 30

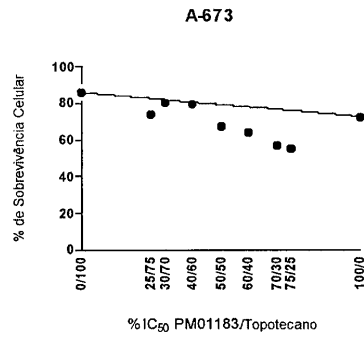


Figura 31

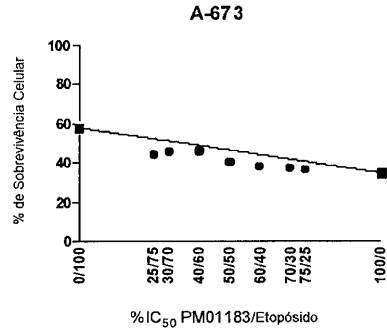


Figura 32

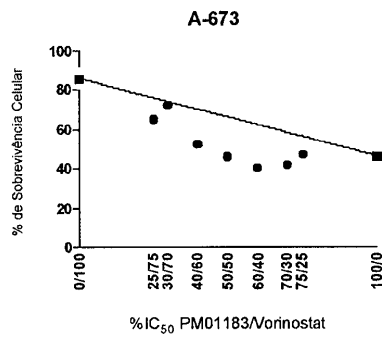


Figura 33

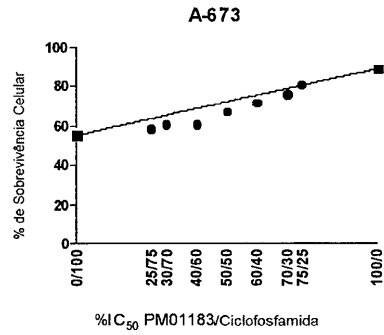


Figura 34

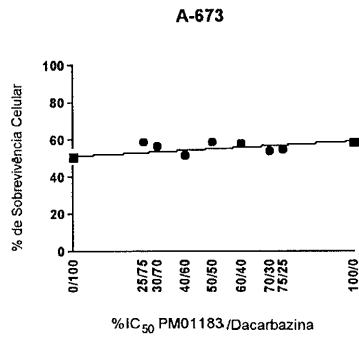


Figura 35

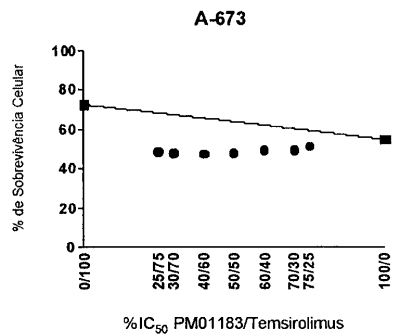


Figura 36

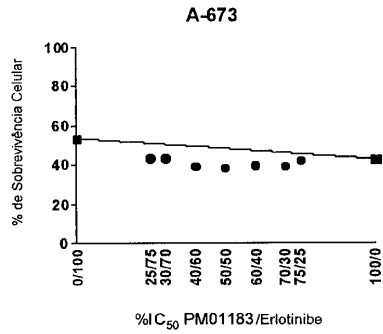


Figura 37

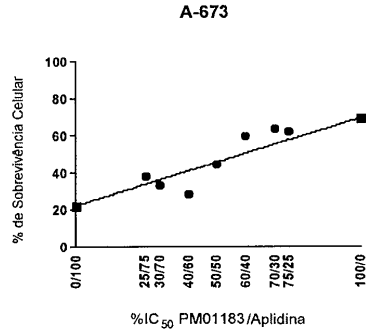


Figura 38

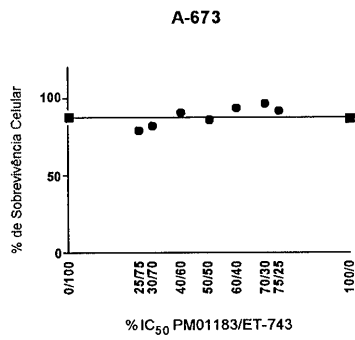


Figura 39

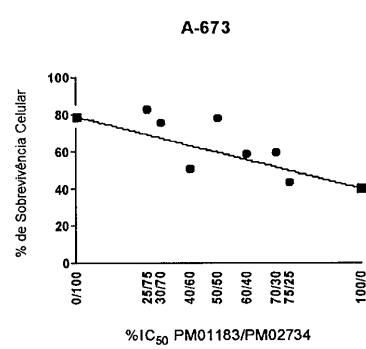


Figura 40

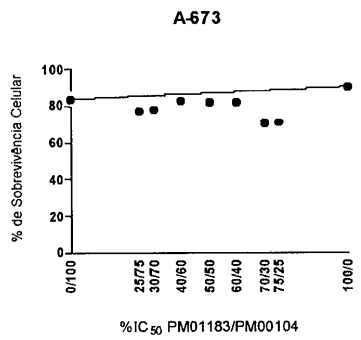


Figura 41

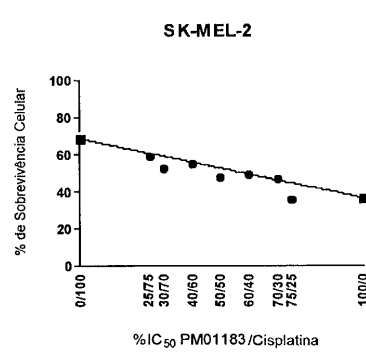


Figura 42

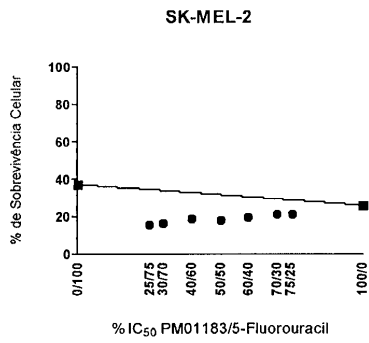


Figura 43

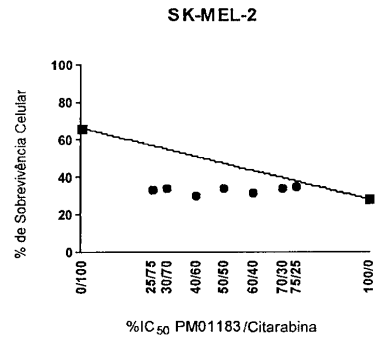


Figura 44

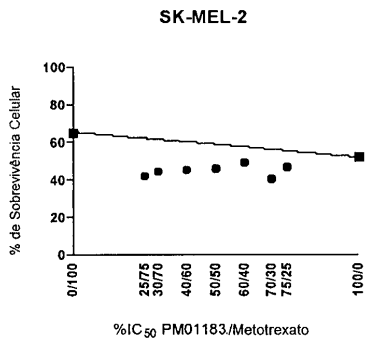


Figura 45

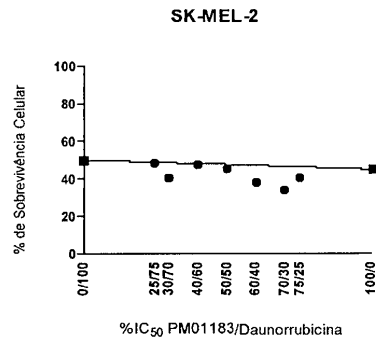


Figura 46

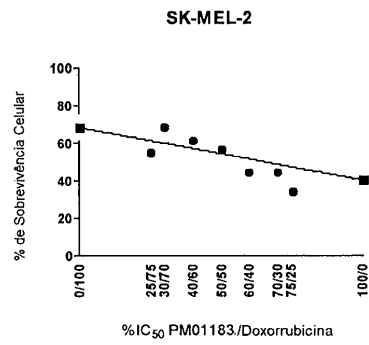


Figura 47

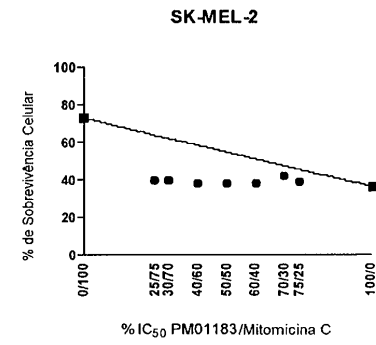


Figura 48

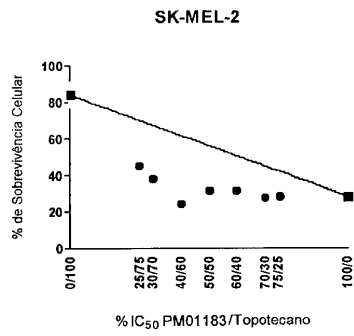


Figura 49

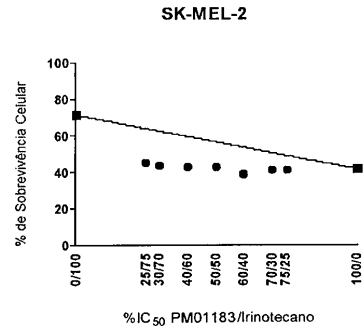


Figura 50

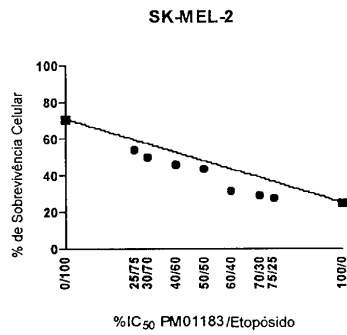


Figura 51

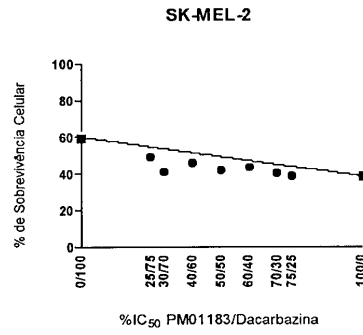


Figura 52

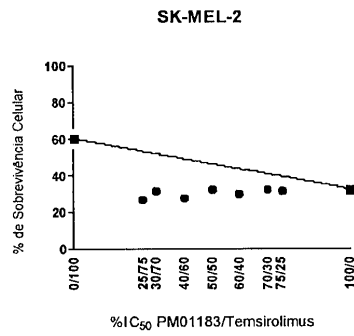


Figura 53

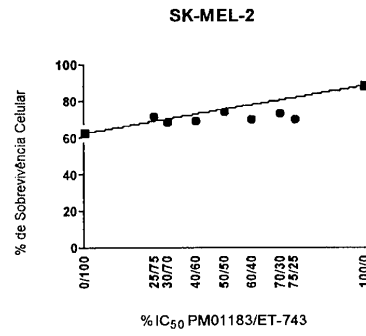


Figura 54

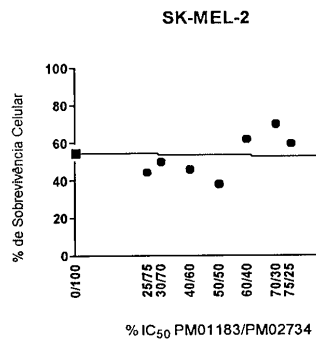


Figura 55

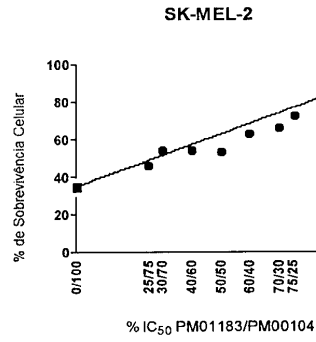


Figura 56

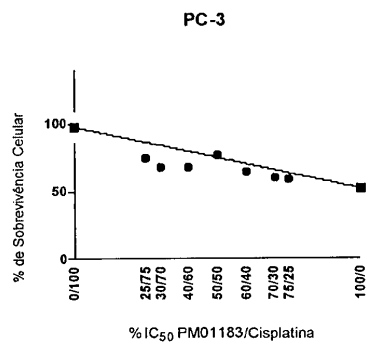


Figura 57

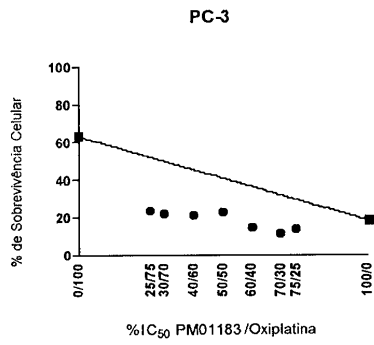


Figura 58

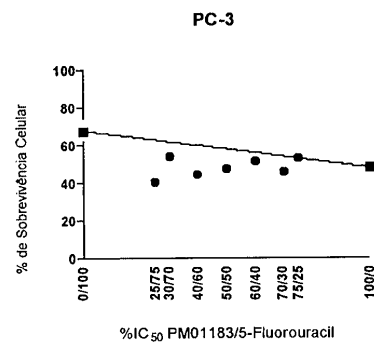


Figura 59

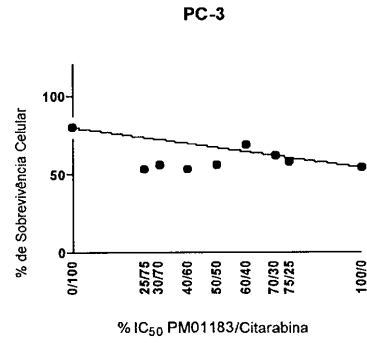


Figura 60

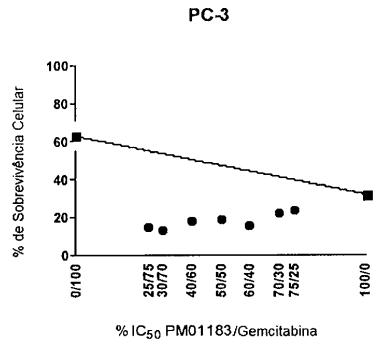


Figura 61

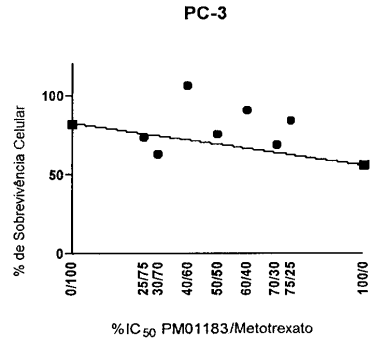


Figura 62

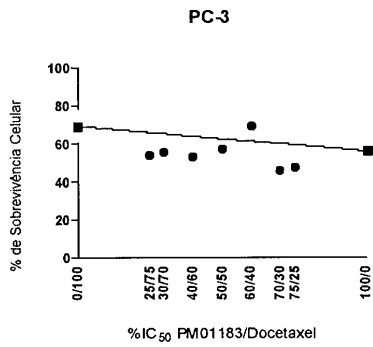


Figura 63

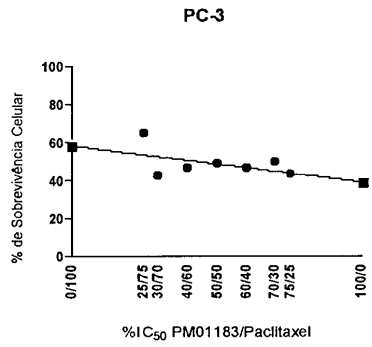


Figura 64

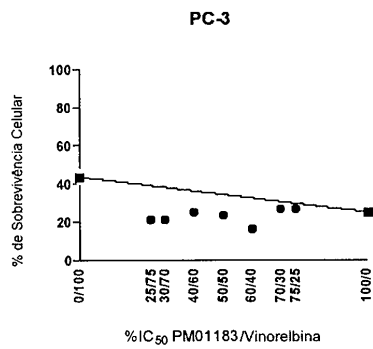


Figura 65

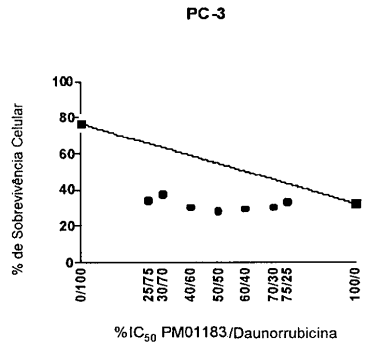


Figura 66

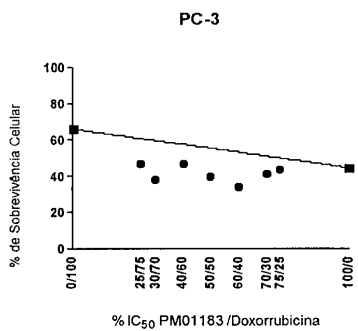


Figura 67

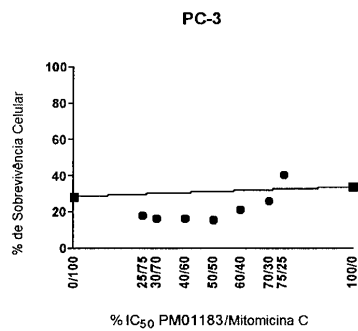


Figura 68

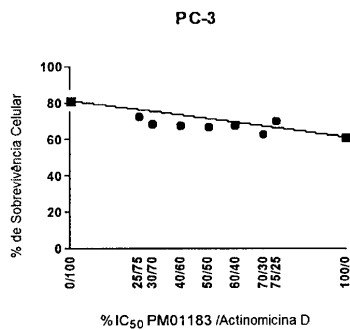


Figura 69

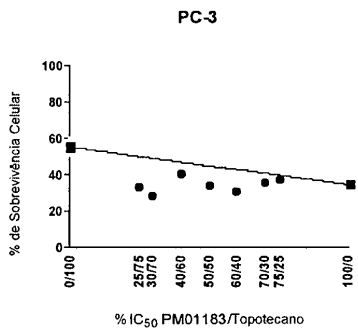


Figura 70

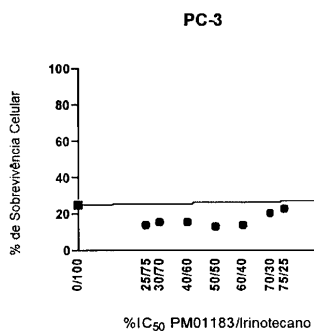


Figura 71

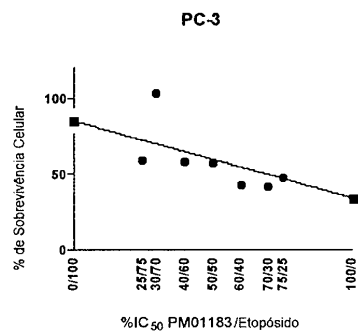


Figura 72

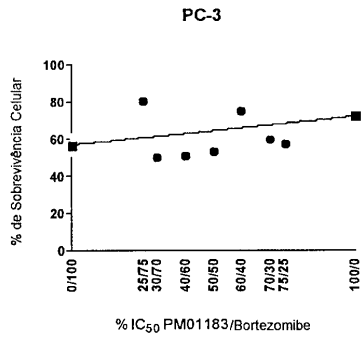


Figura 73

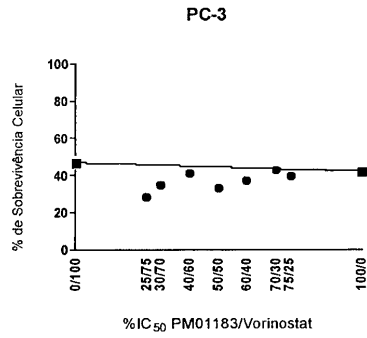


Figura 74

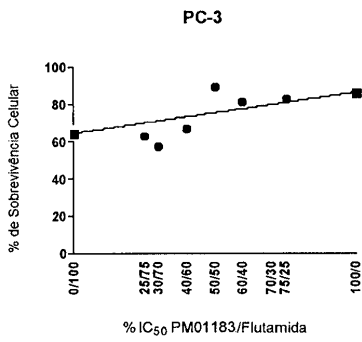


Figura 75

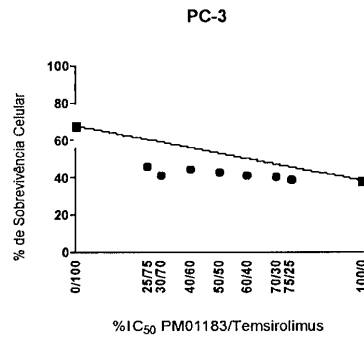


Figura 76

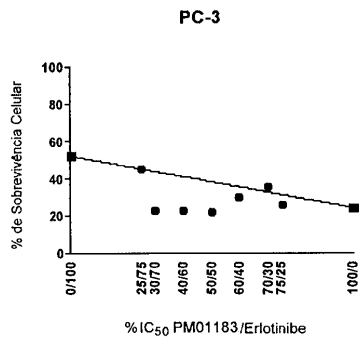


Figura 77

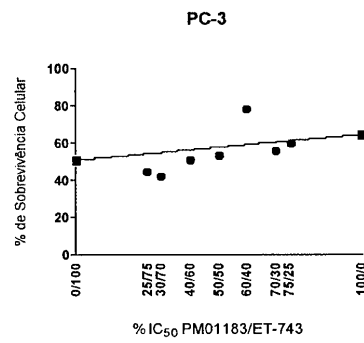


Figura 78

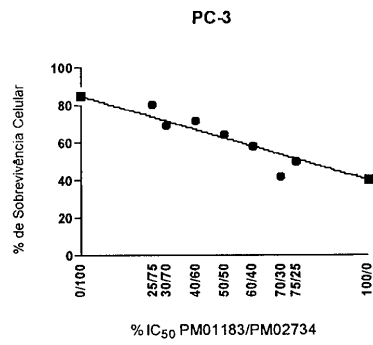


Figura 79

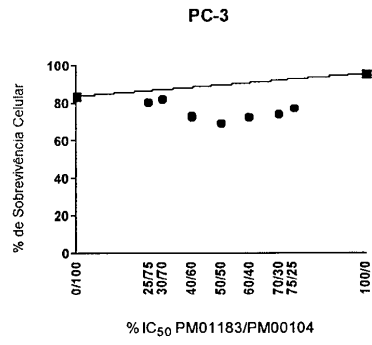


Figura 80

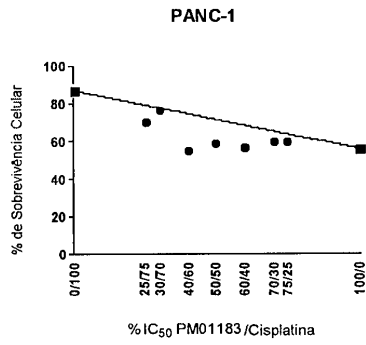


Figura 81

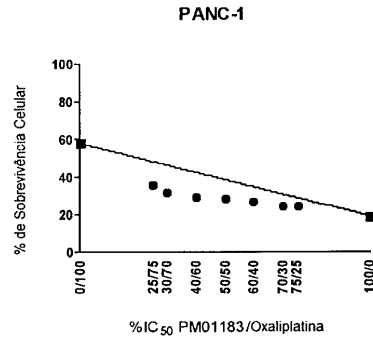


Figura 82

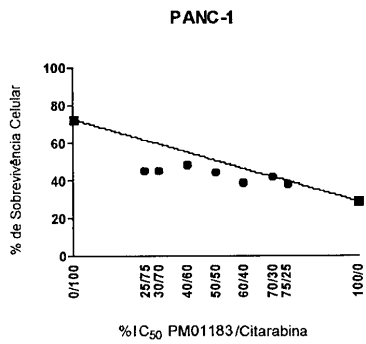


Figura 83

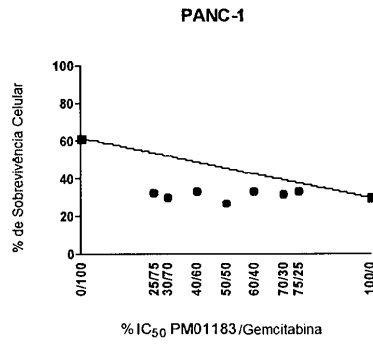


Figura 84

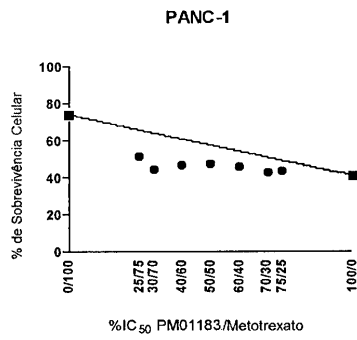


Figura 85

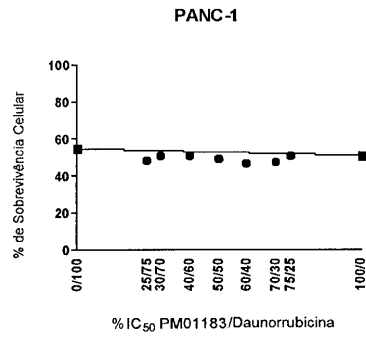


Figura 86

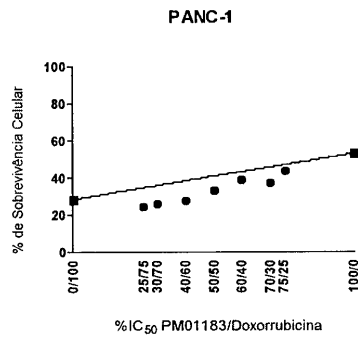


Figura 87

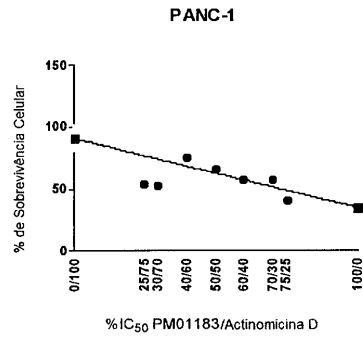


Figura 88

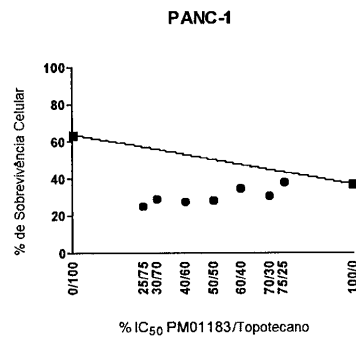


Figura 89

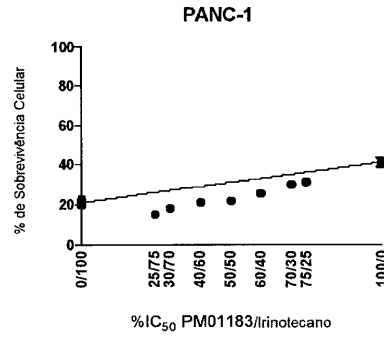


Figura 90

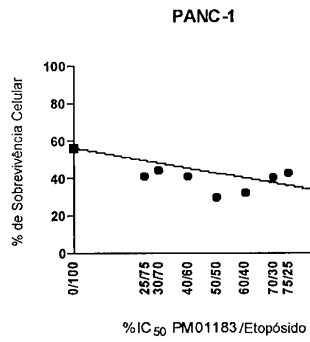


Figura 91

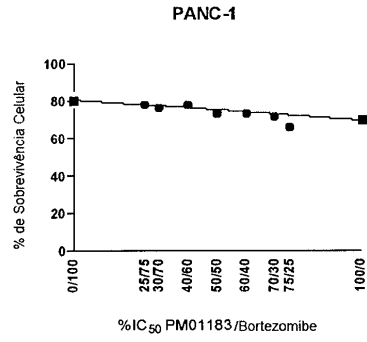


Figura 92

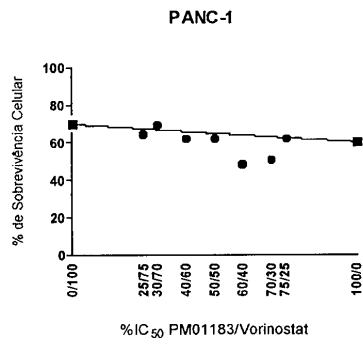


Figura 93

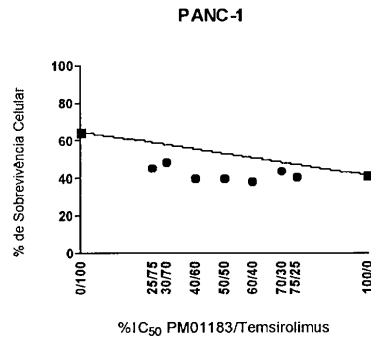


Figura 94

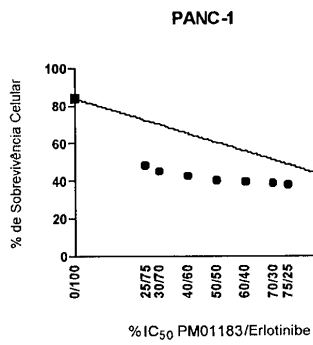


Figura 95

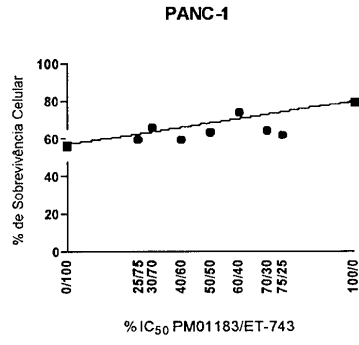


Figura 96

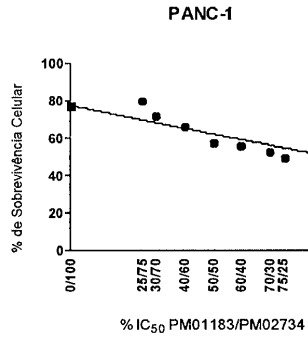


Figura 97

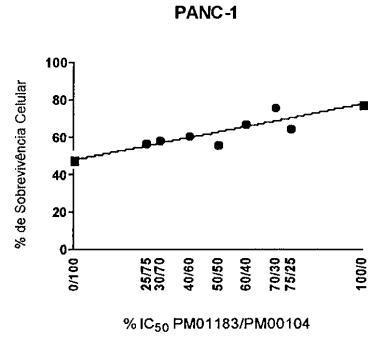


Figura 98

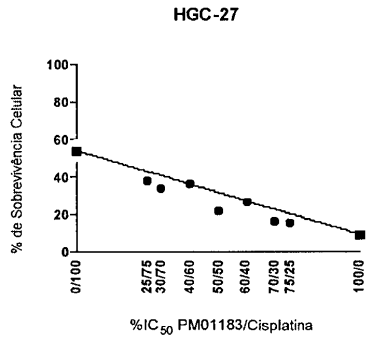


Figura 99

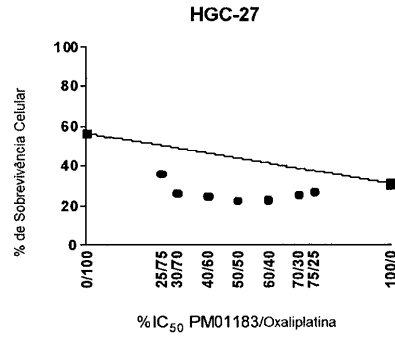


Figura 100

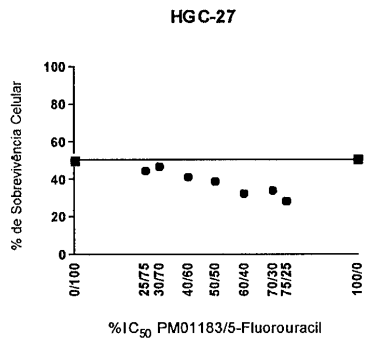


Figura 101

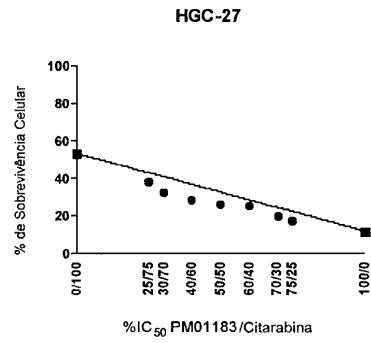


Figura 102

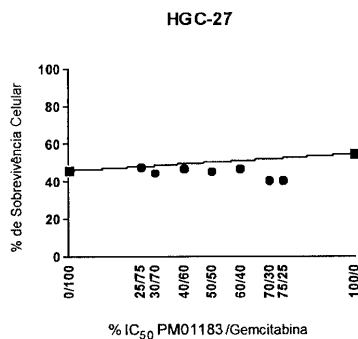


Figura 103

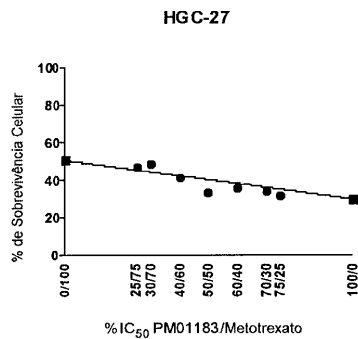


Figura 104

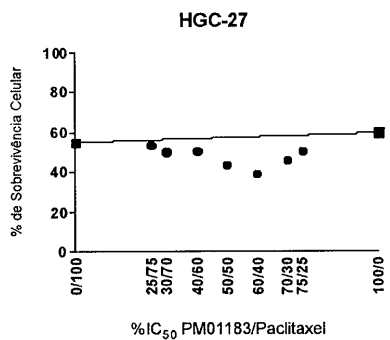


Figura 105

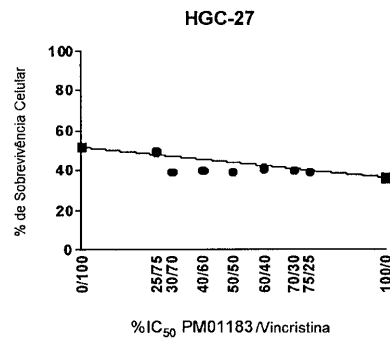


Figura 106

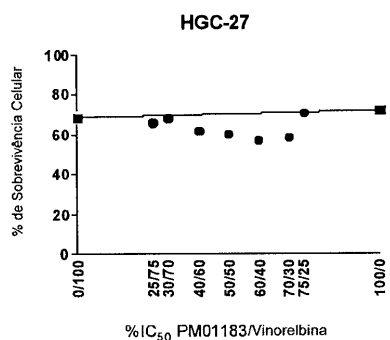


Figura 107

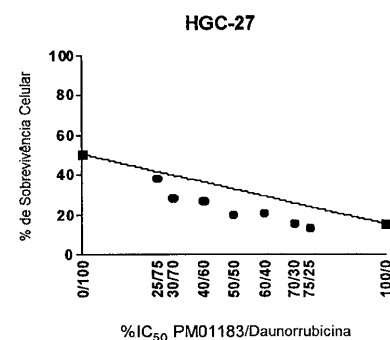


Figura 108

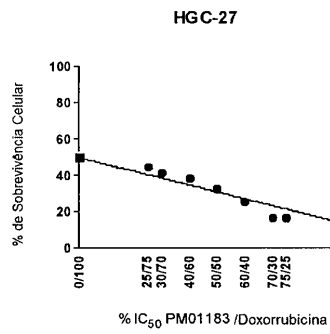


Figura 109

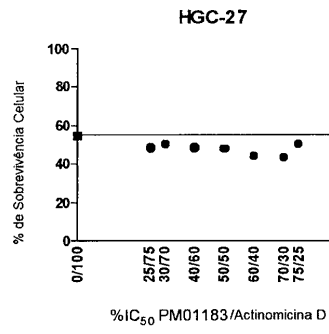


Figura 110

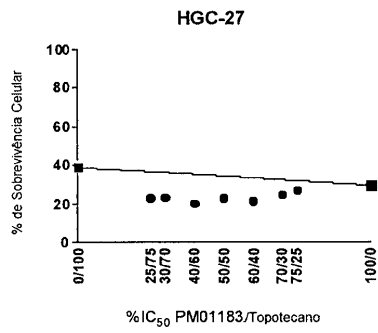


Figura 111

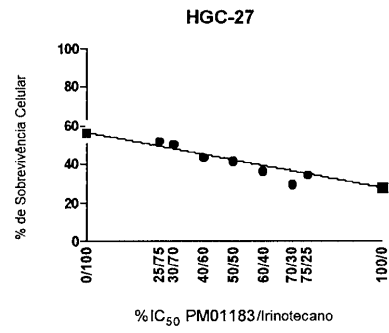


Figura 112

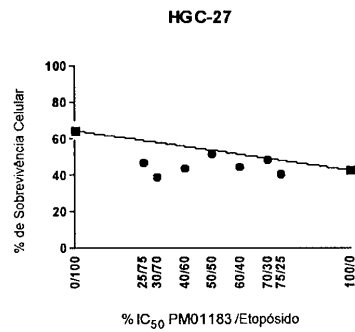


Figura 113

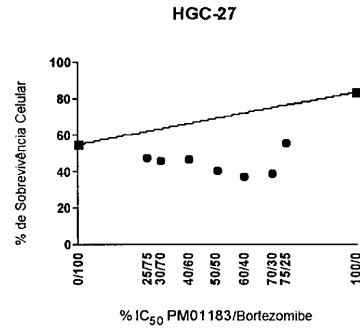


Figura 114

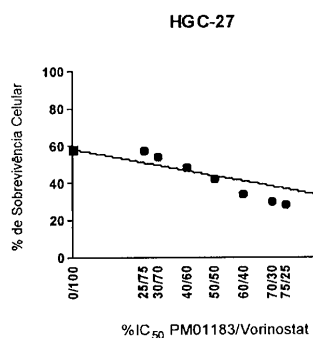


Figura 115

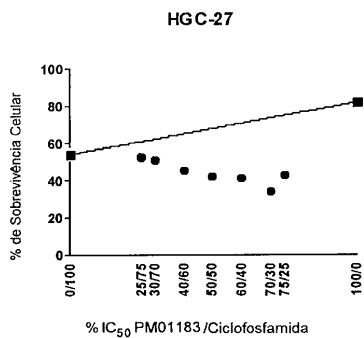


Figura 116

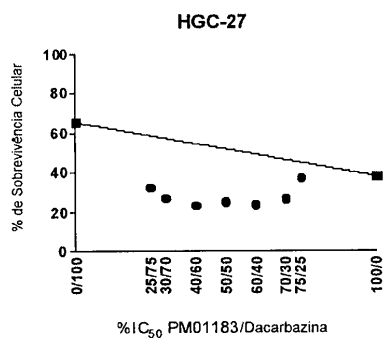


Figura 117

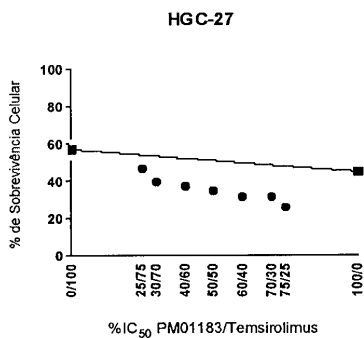


Figura 118

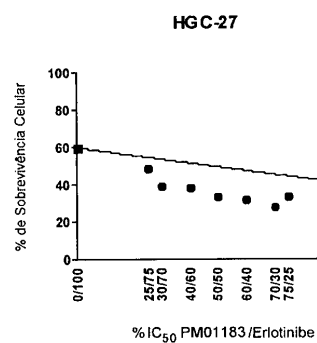


Figura 119

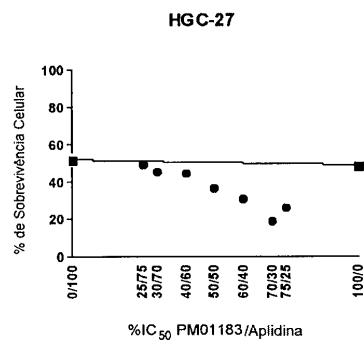


Figura 120

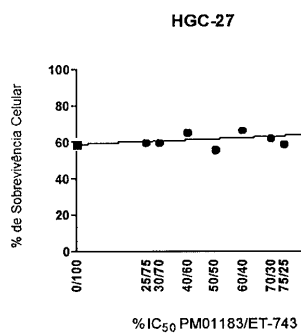


Figura 121

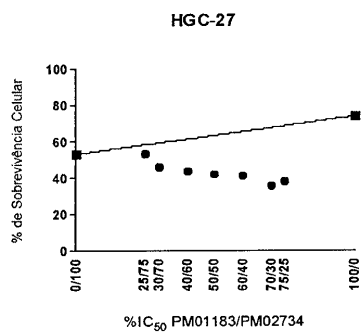


Figura 122

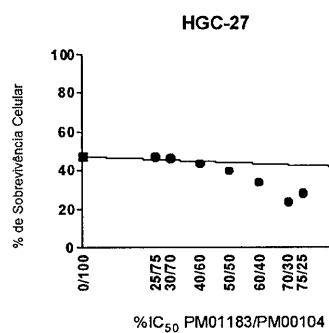


Figura 123

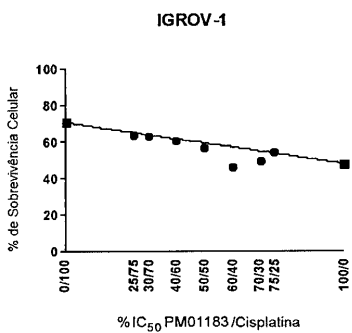


Figura 124

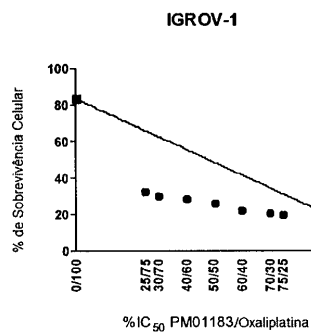


Figura 125

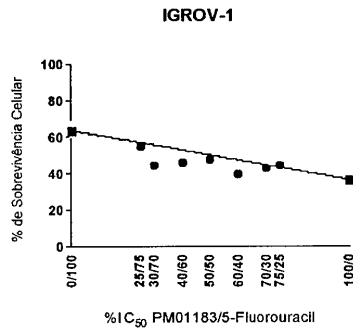


Figura 126

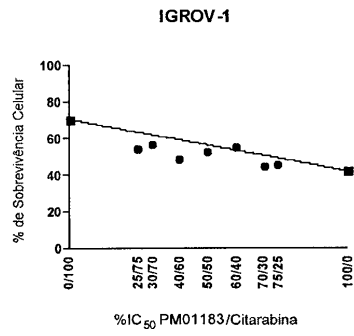


Figura 127

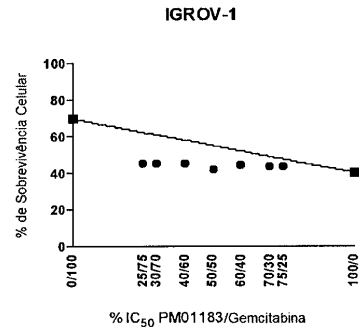


Figura 128

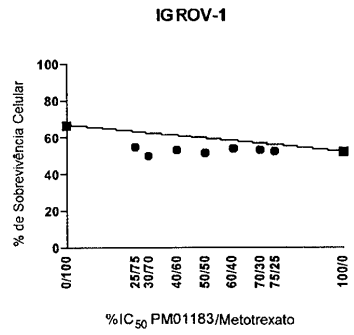


Figura 129

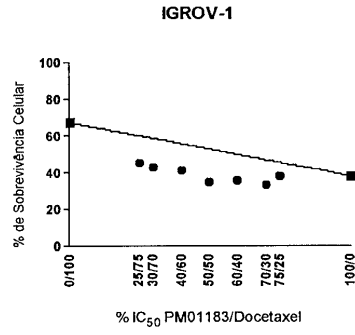


Figura 130

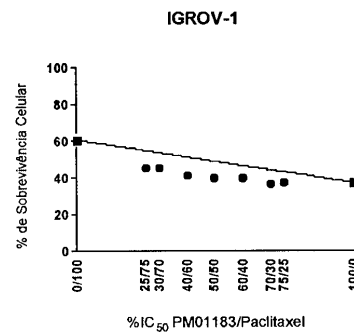


Figura 131

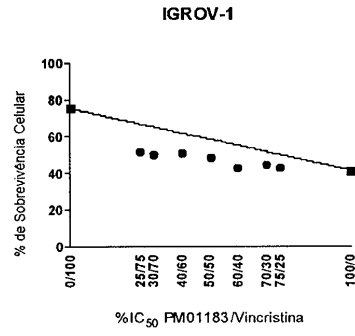


Figura 132

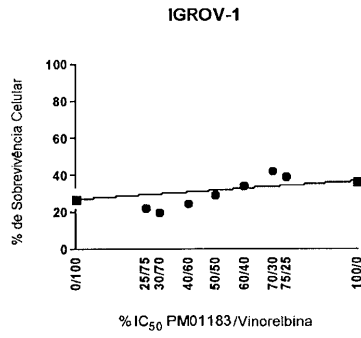


Figura 133

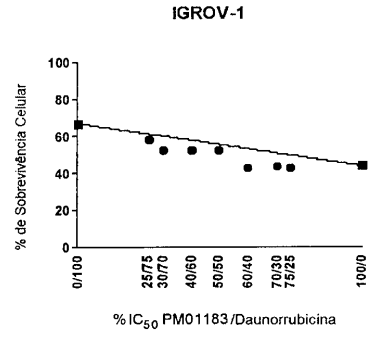


Figura 134

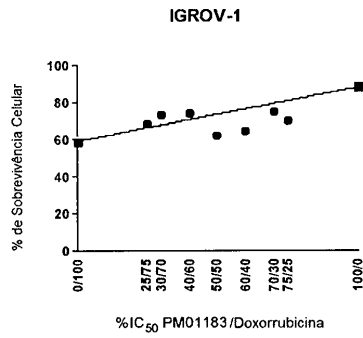


Figura 135

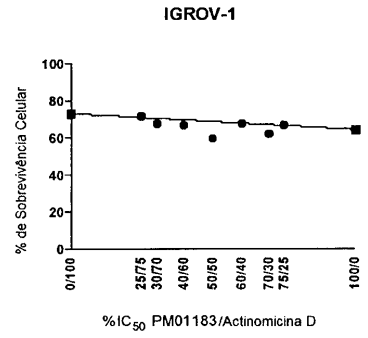


Figura 136

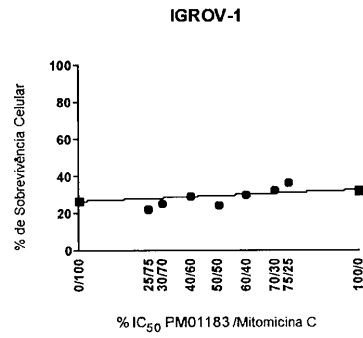


Figura 137

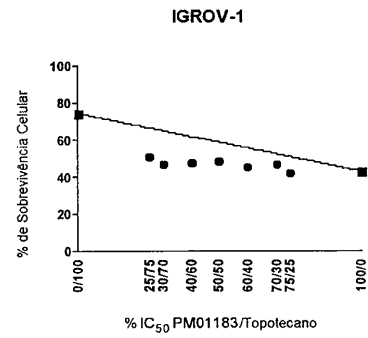


Figura 138

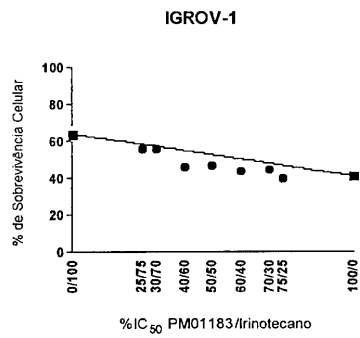


Figura 139

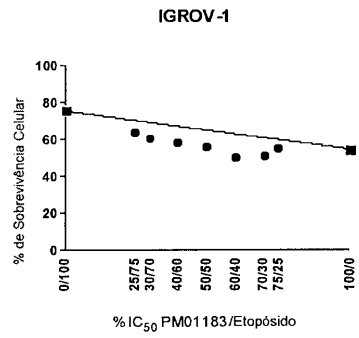


Figura 140

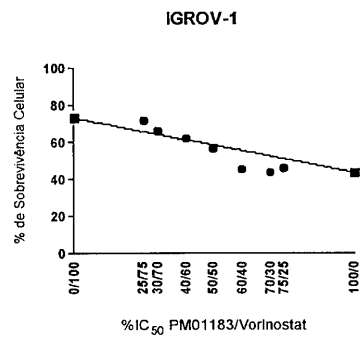


Figura 141

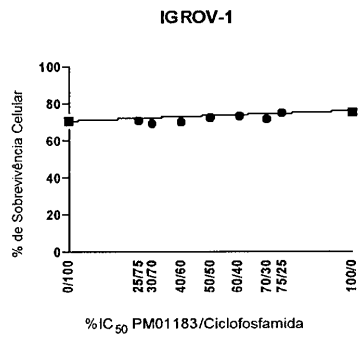


Figura 142

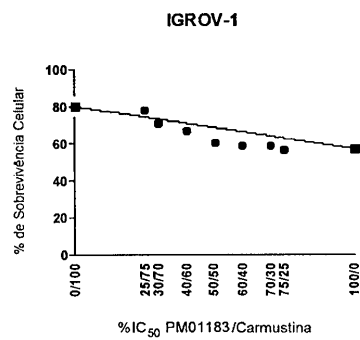


Figura 143

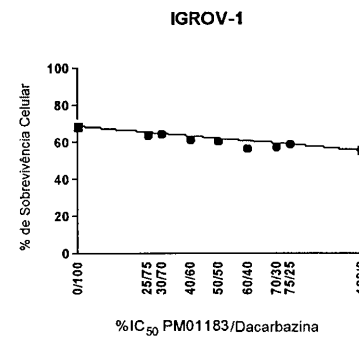


Figura 144

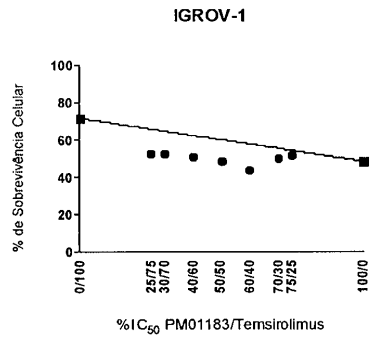


Figura 145

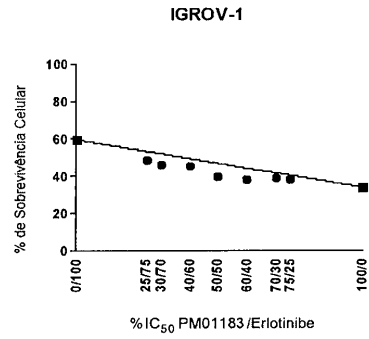


Figura 146

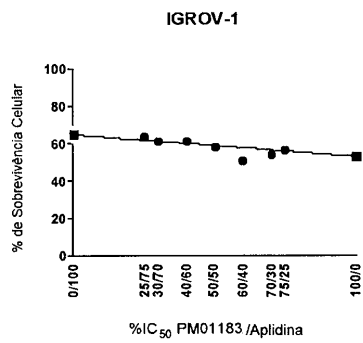


Figura 147

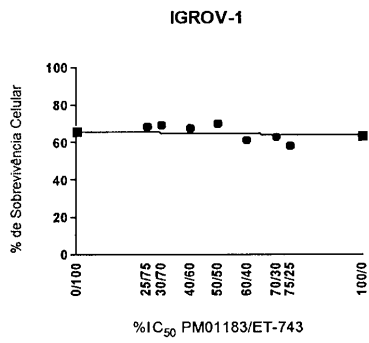


Figura 148

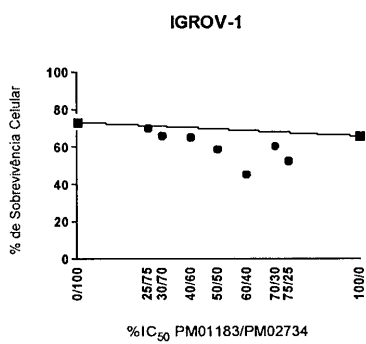


Figura 149

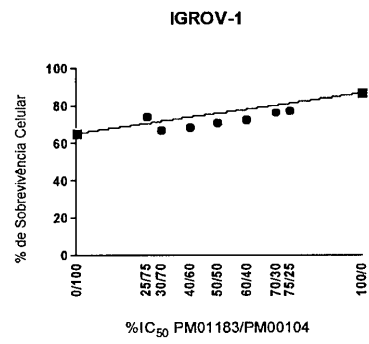


Figura 150

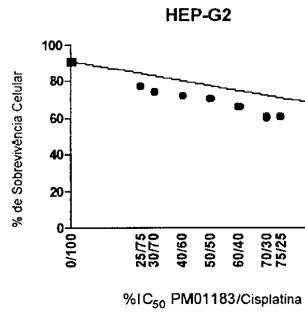


Figura 151

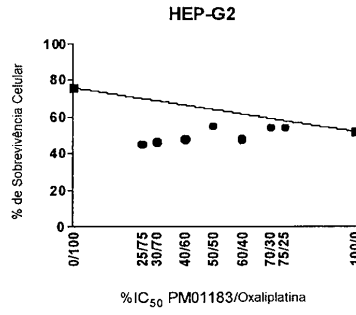


Figura 152

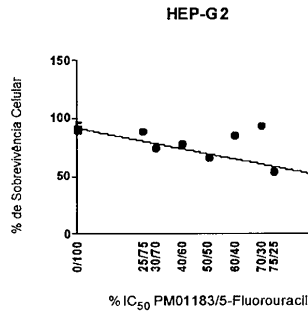


Figura 153

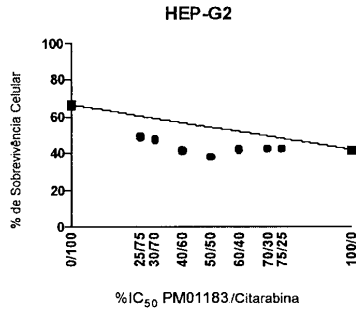


Figura 154

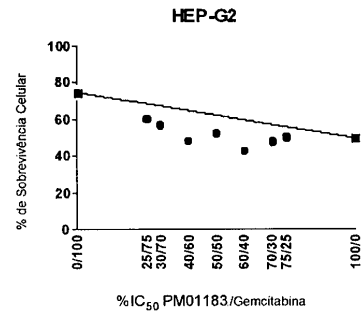


Figura 155

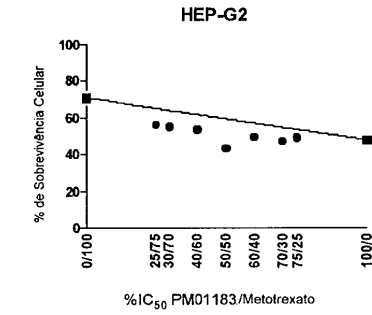


Figura 156

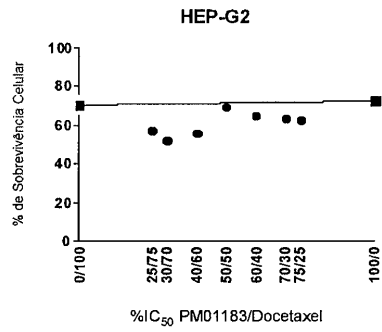


Figura 157

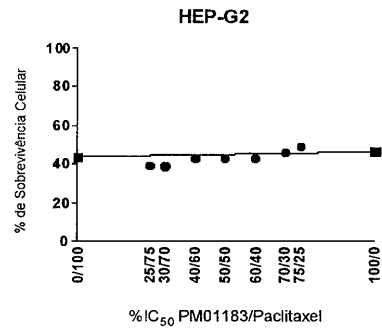


Figura 158

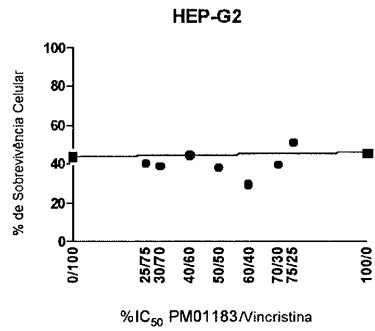


Figura 159

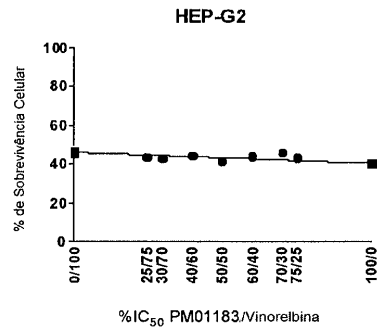


Figura 160

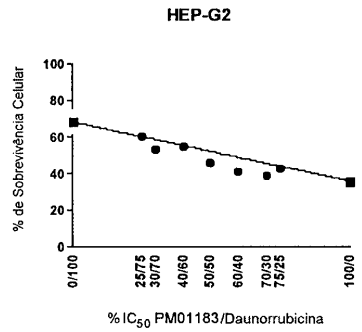


Figura 161

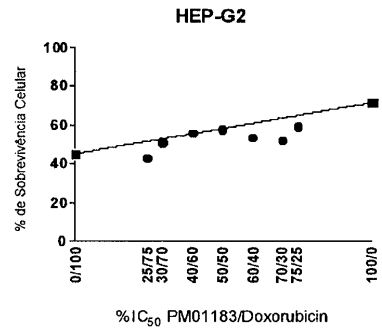


Figura 162

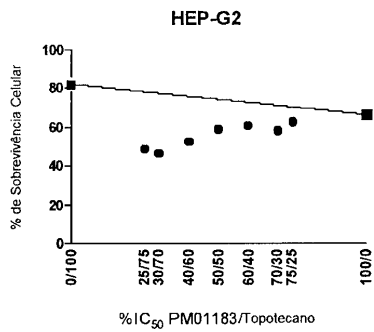


Figura 163

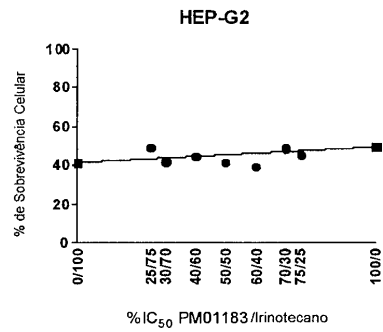


Figura 164

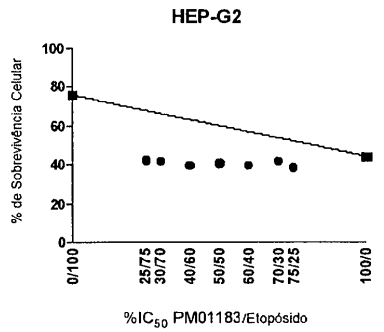


Figura 165

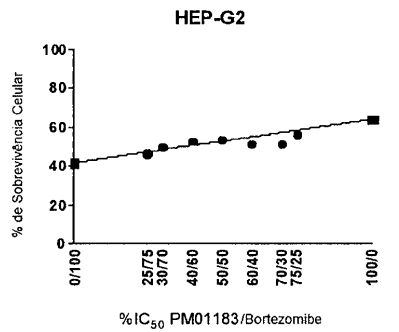


Figura 166

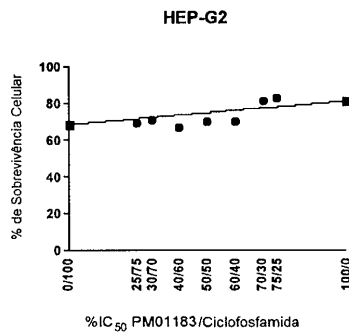


Figura 167

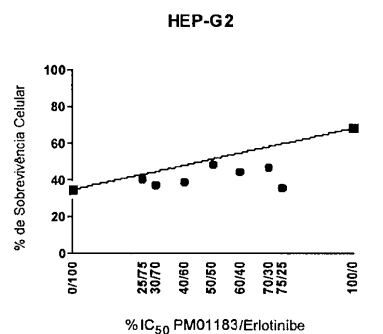


Figura 168

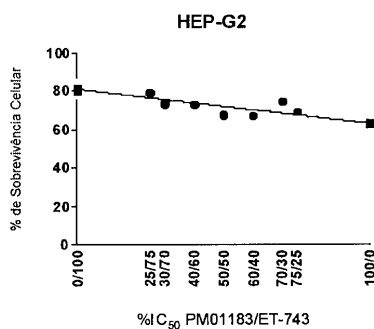


Figura 169

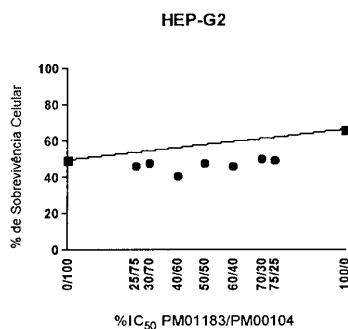


Figura 170

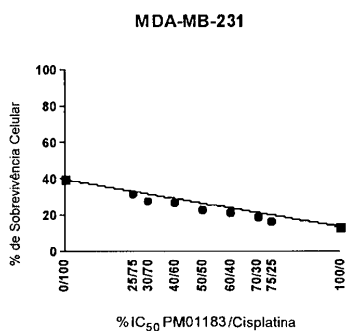


Figura 171

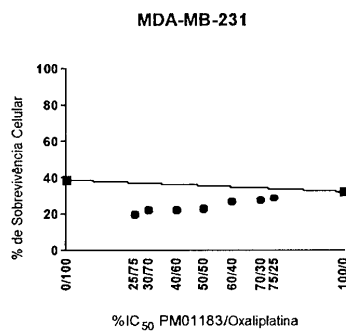


Figura 172

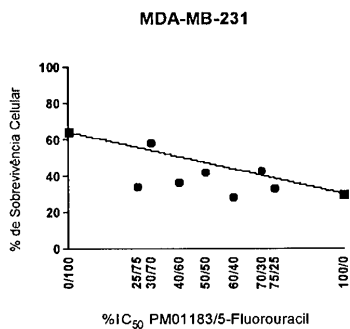


Figura 173

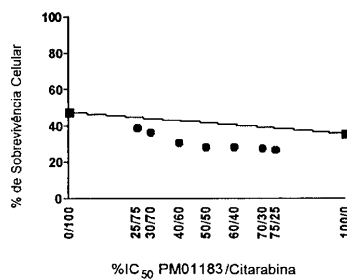


Figura 174

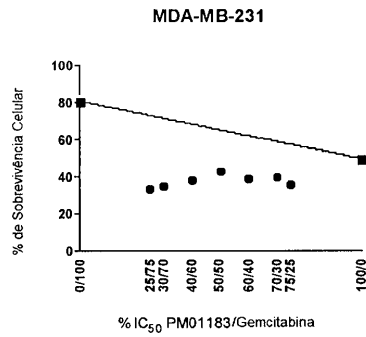


Figura 175

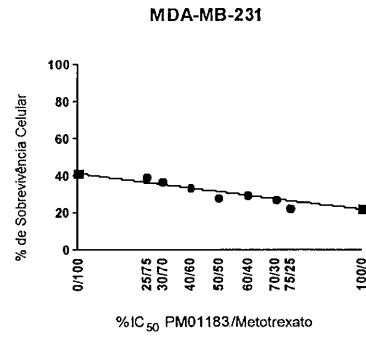


Figura 176

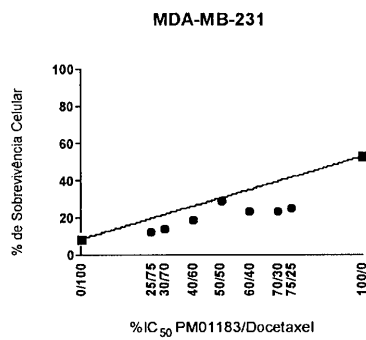


Figura 177

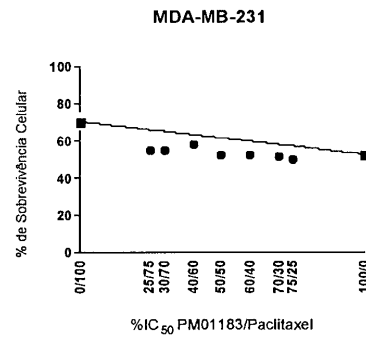


Figura 178

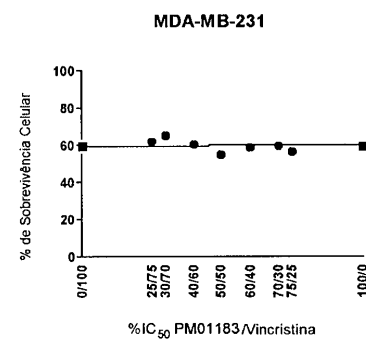


Figura 179

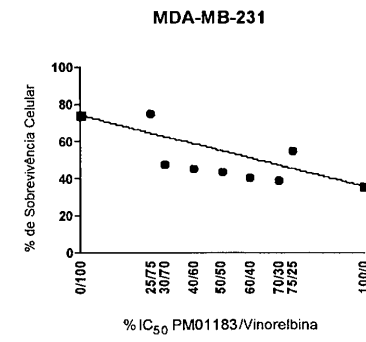


Figura 180

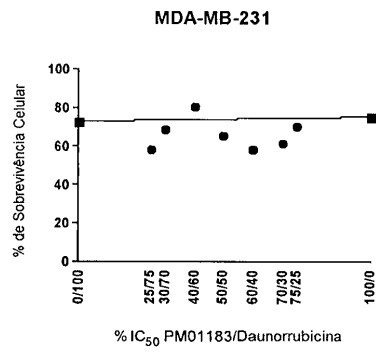


Figura 181

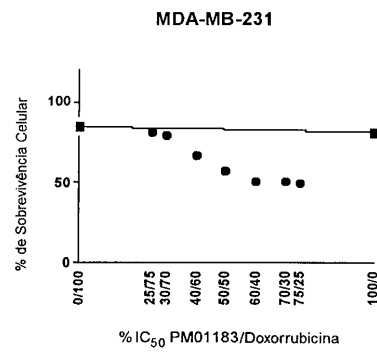


Figura 182

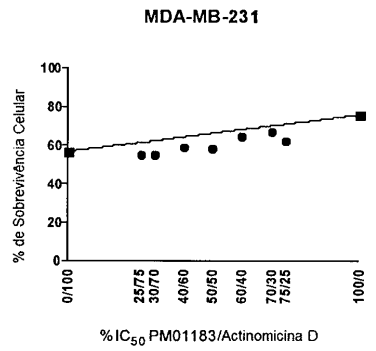


Figura 183

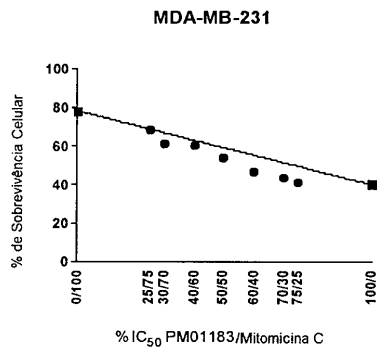


Figura 184

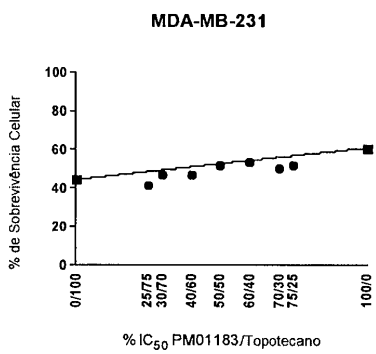


Figura 185

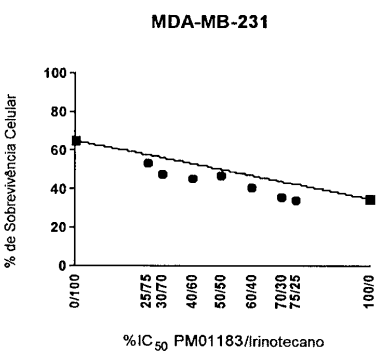


Figura 186

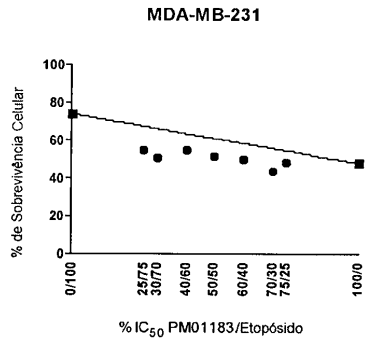


Figura 187

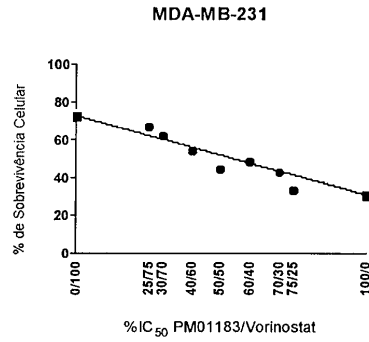


Figura 188

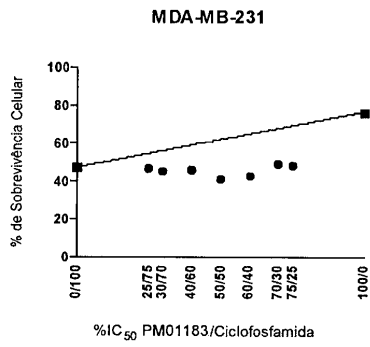


Figura 189

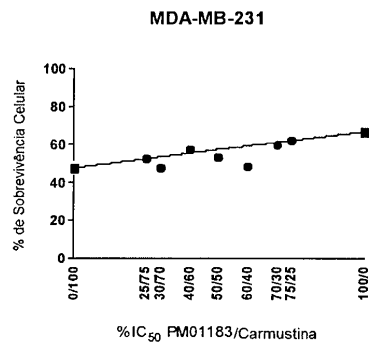


Figura 190

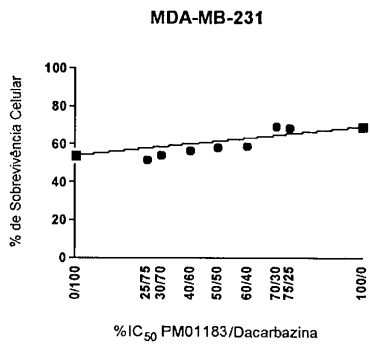


Figura 191

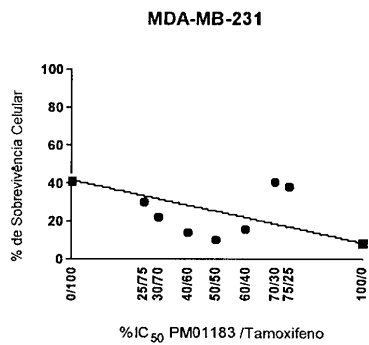


Figura 192

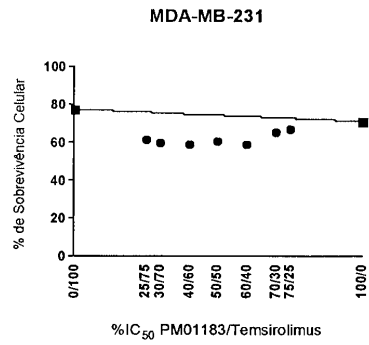


Figura 193

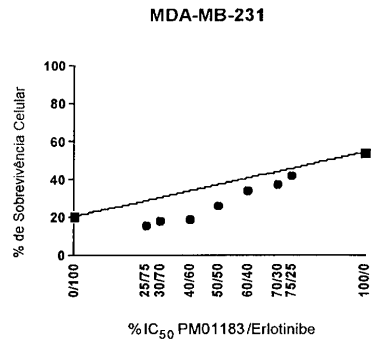


Figura 194

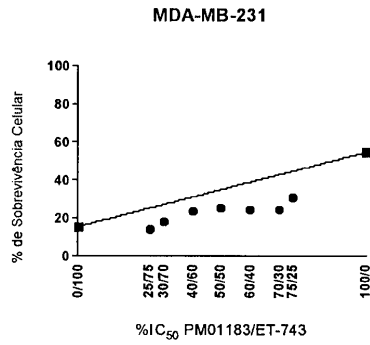


Figura 195

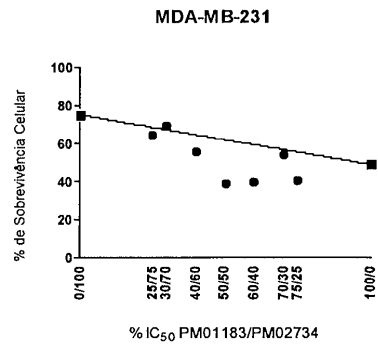


Figura 196

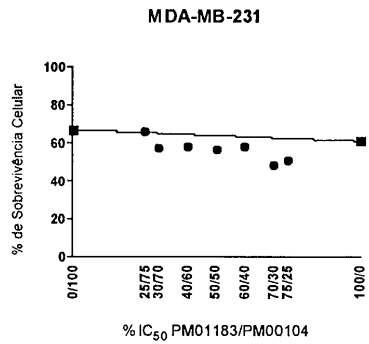


Figura 197

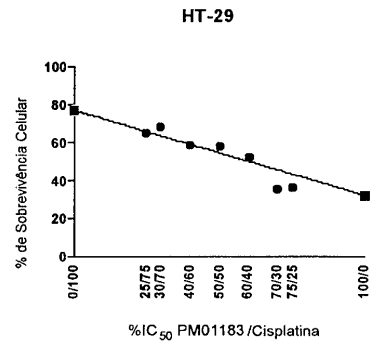


Figura 198

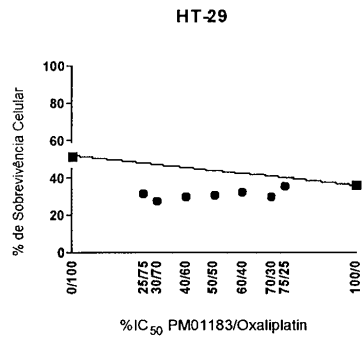


Figure 199

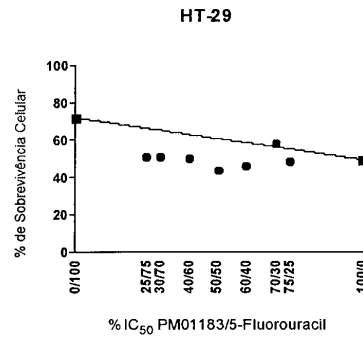


Figure 200

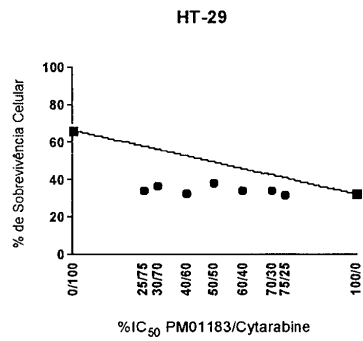


Figura 201

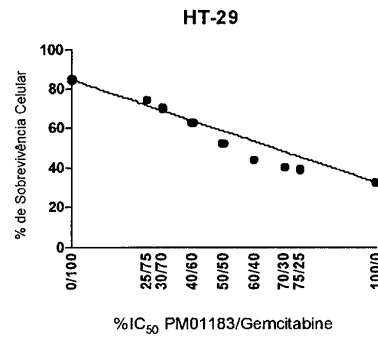


Figura 202

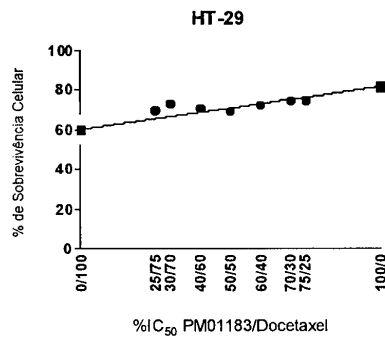


Figura 203

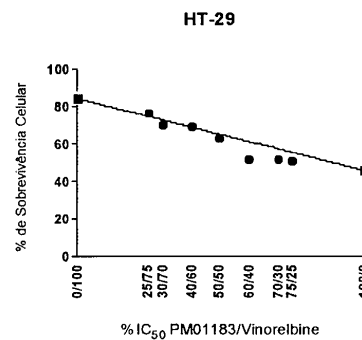


Figura 204

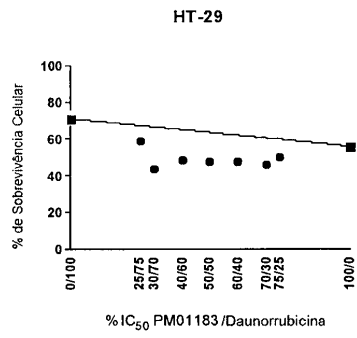


Figura 205

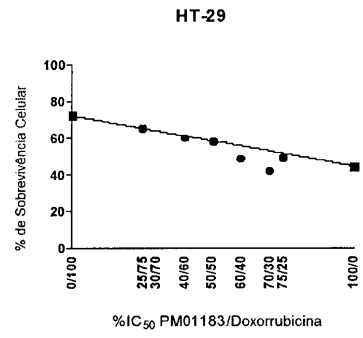


Figura 206

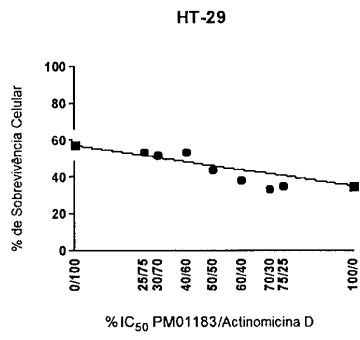


Figura 207

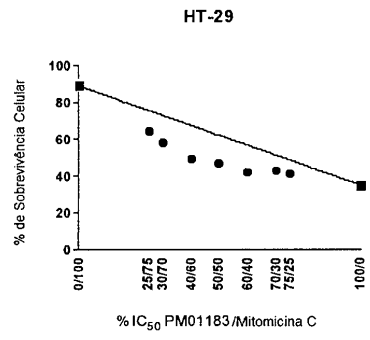


Figura 208

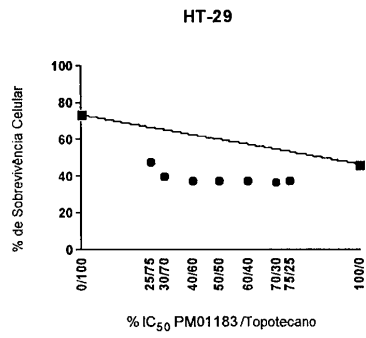


Figura 209

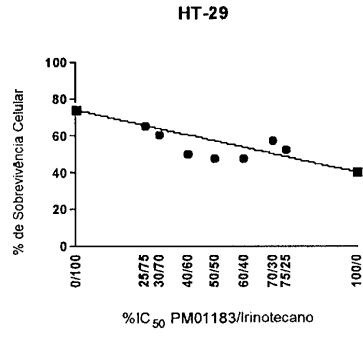


Figura 210

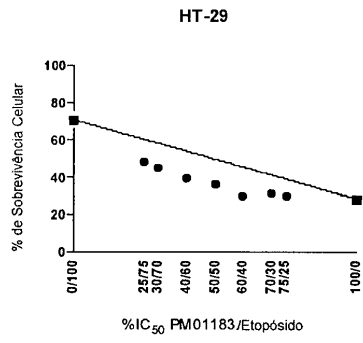


Figura 211

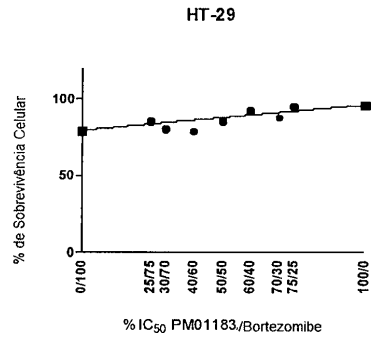


Figura 212

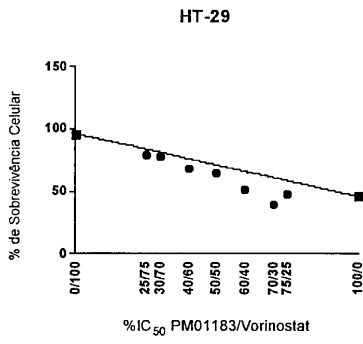


Figura 213

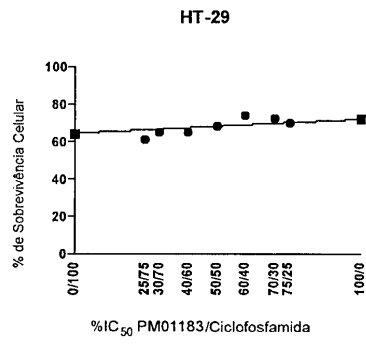


Figura 214

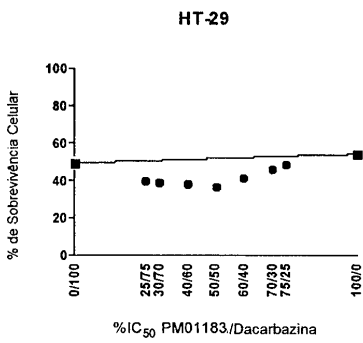


Figura 215

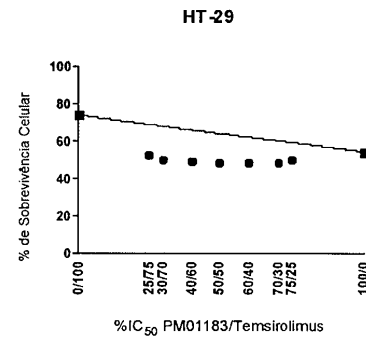


Figura 216

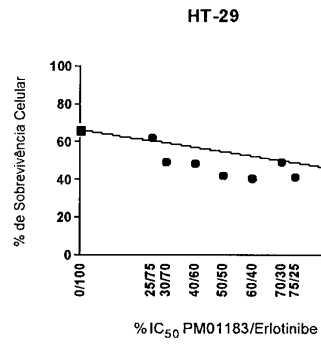


Figura 217

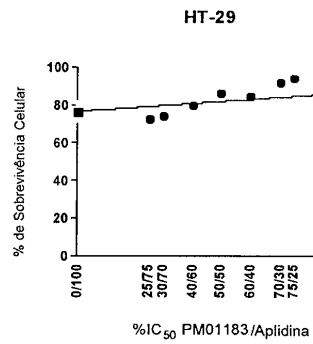


Figura 218

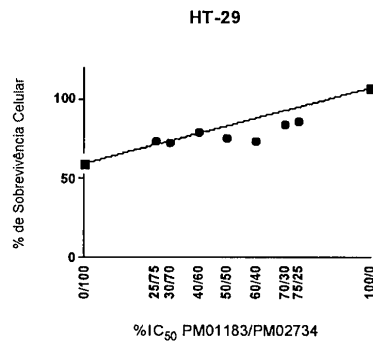


Figura 219

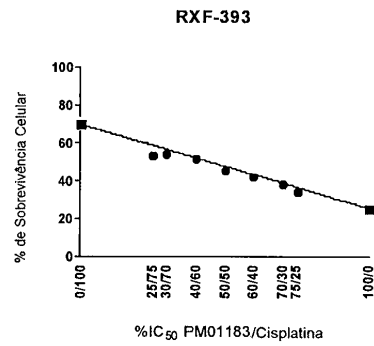


Figura 220

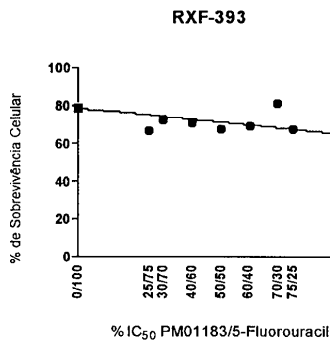


Figura 221

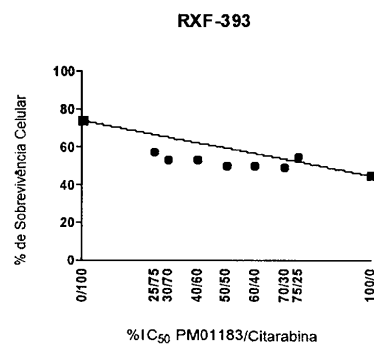


Figura 222

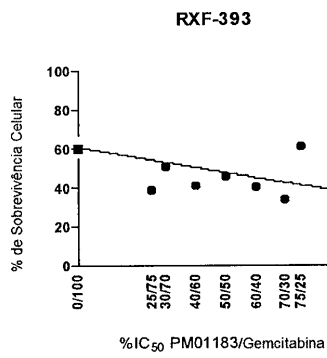


Figura 223

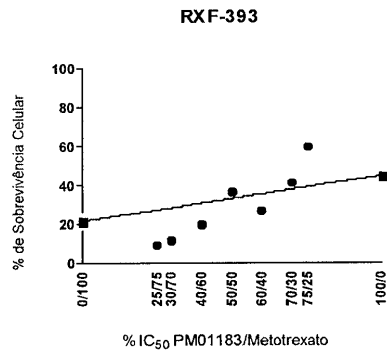


Figura 224

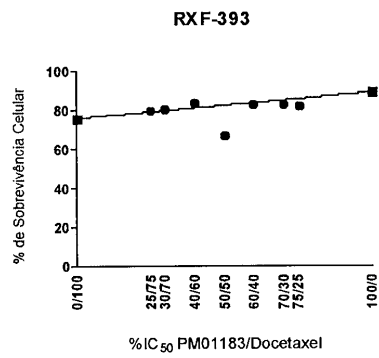


Figura 225

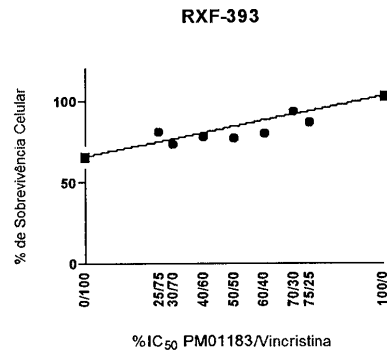


Figura 226

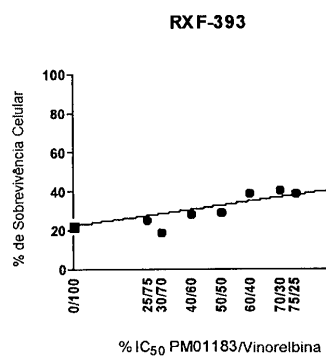


Figura 227

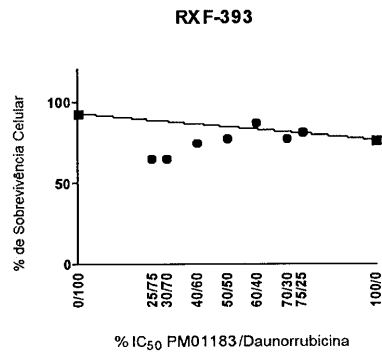


Figura 228

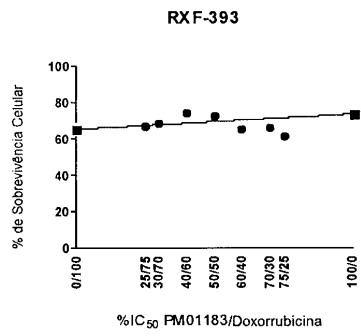


Figura 229

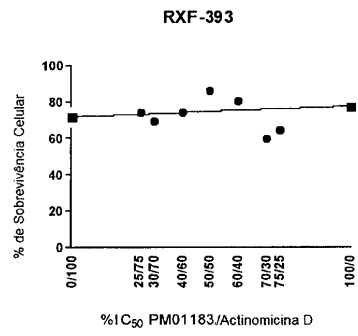


Figura 230

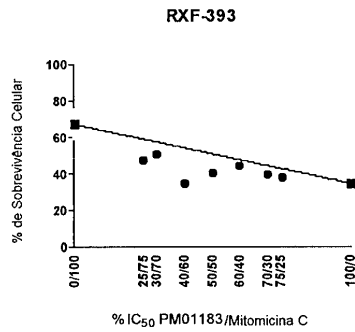


Figura 231

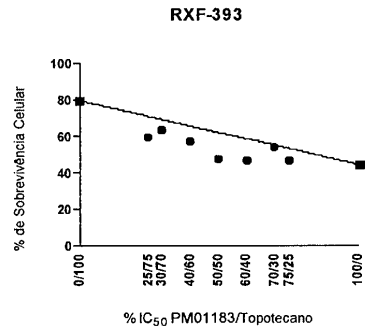


Figura 232

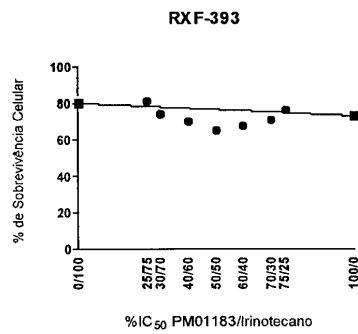


Figura 233

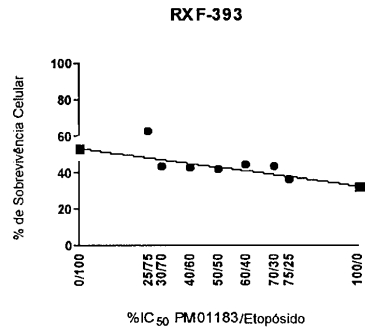


Figura 234

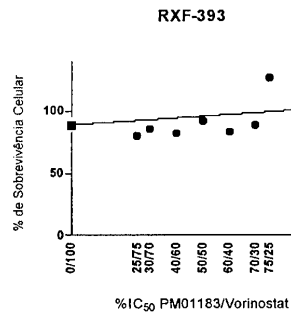


Figura 235

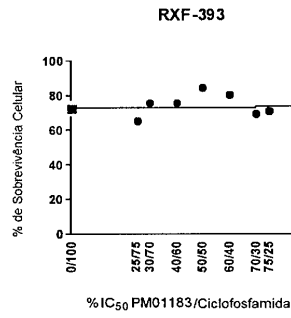


Figura 236

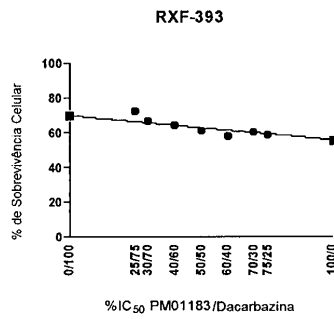


Figura 237

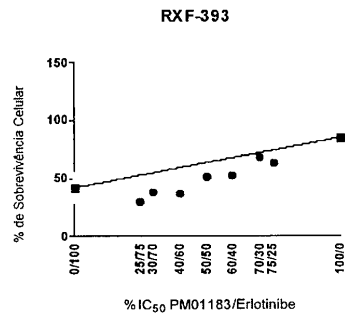


Figura 238

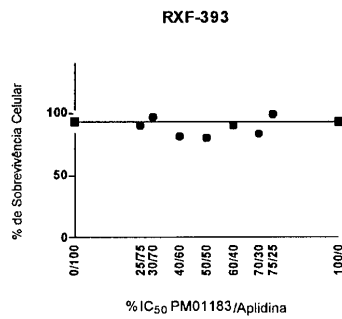


Figura 239

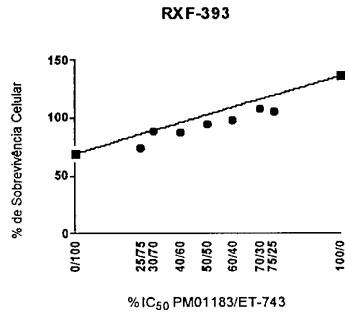


Figura 240

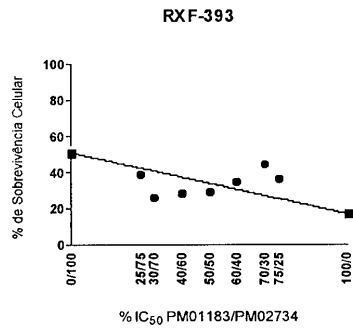


Figura 241

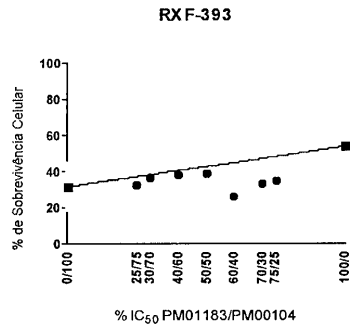


Figura 242

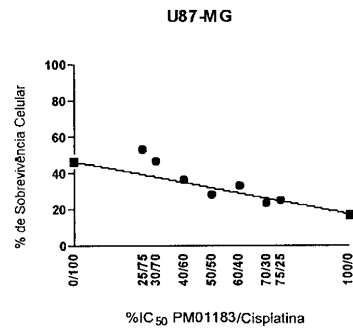


Figura 243

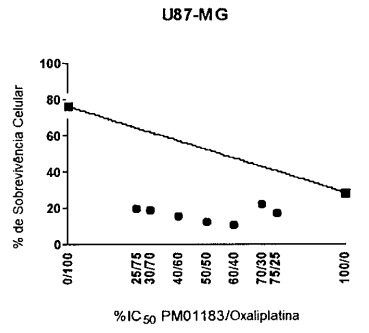


Figura 244

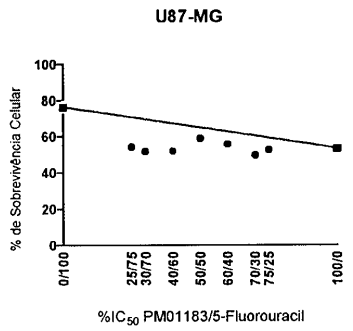


Figura 245

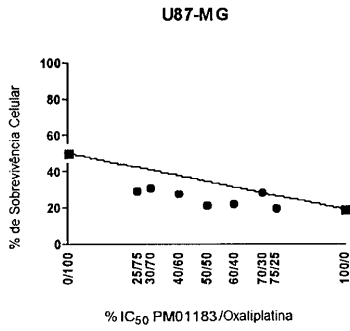


Figura 246

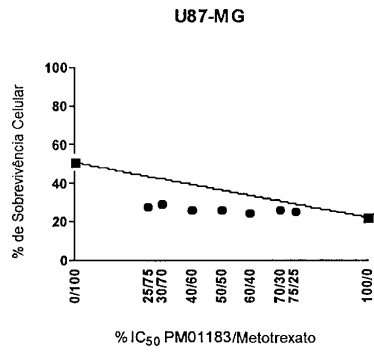


Figura 247

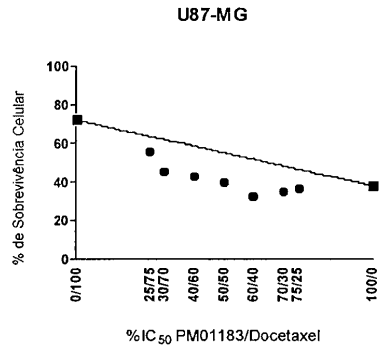


Figura 248

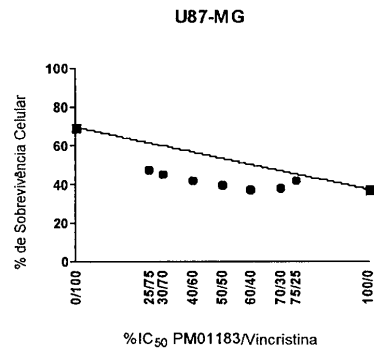


Figura 249

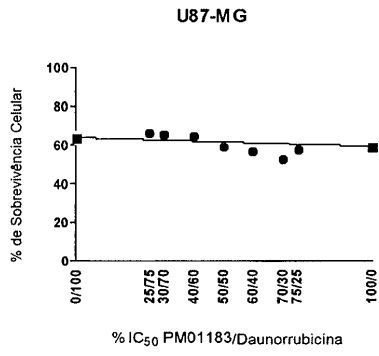


Figura 250

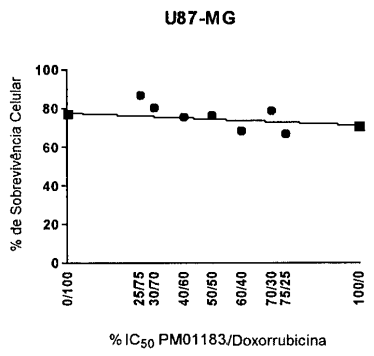


Figura 251

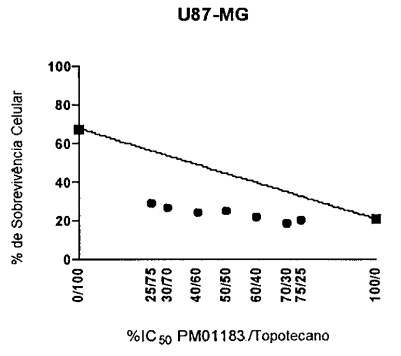


Figura 252

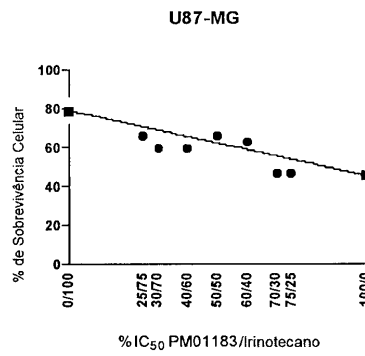


Figura 253

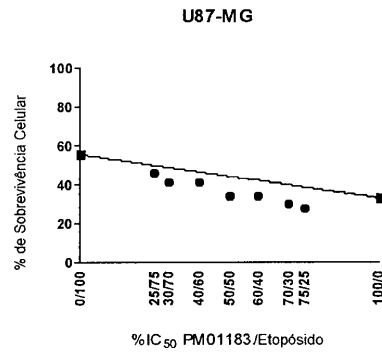


Figura 254

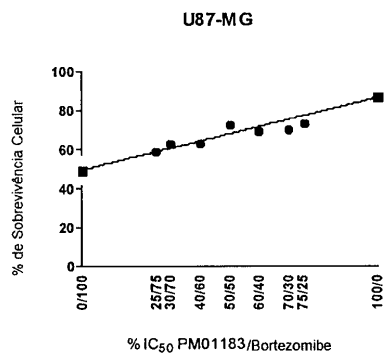


Figura 255

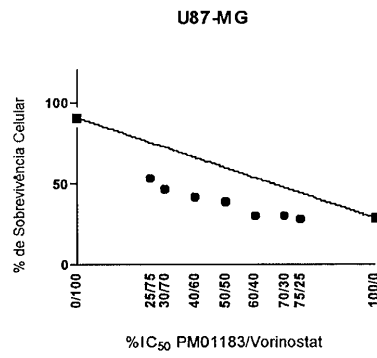


Figura 256

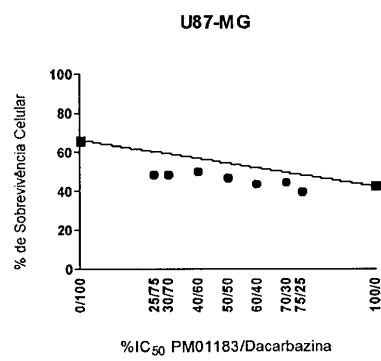


Figura 257

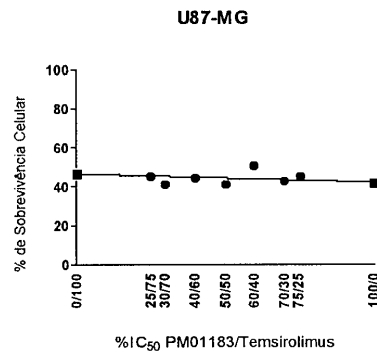


Figura 258

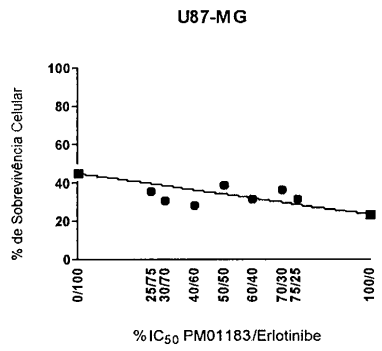


Figura 259

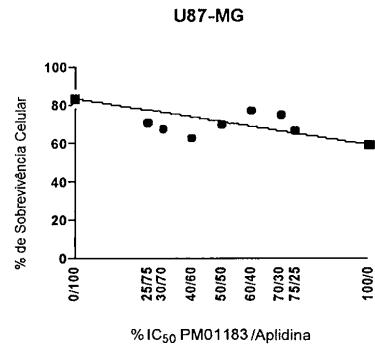


Figura 260

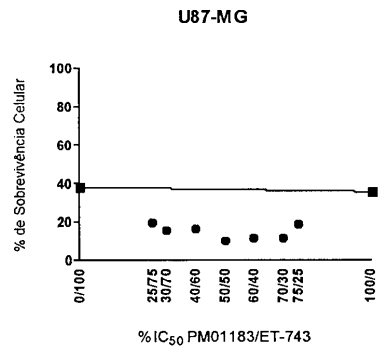


Figura 261

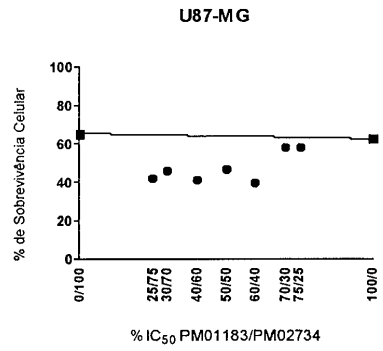


Figura 262

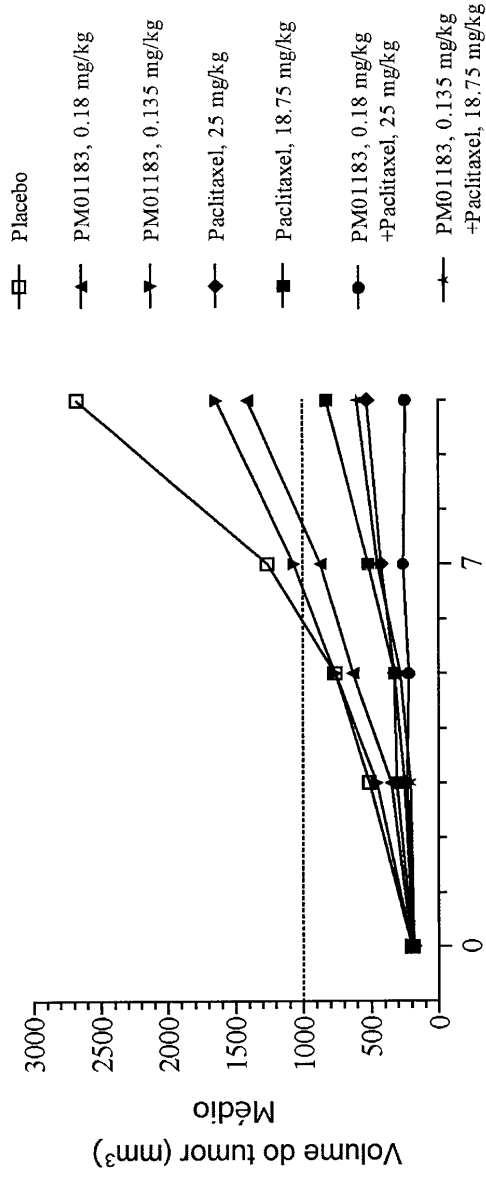


Figura 263

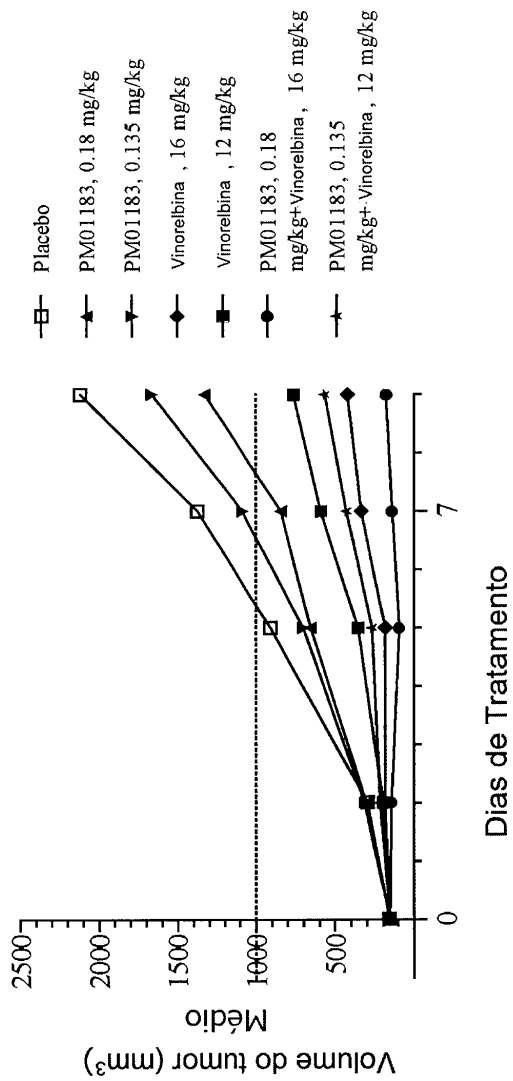


Figura 264

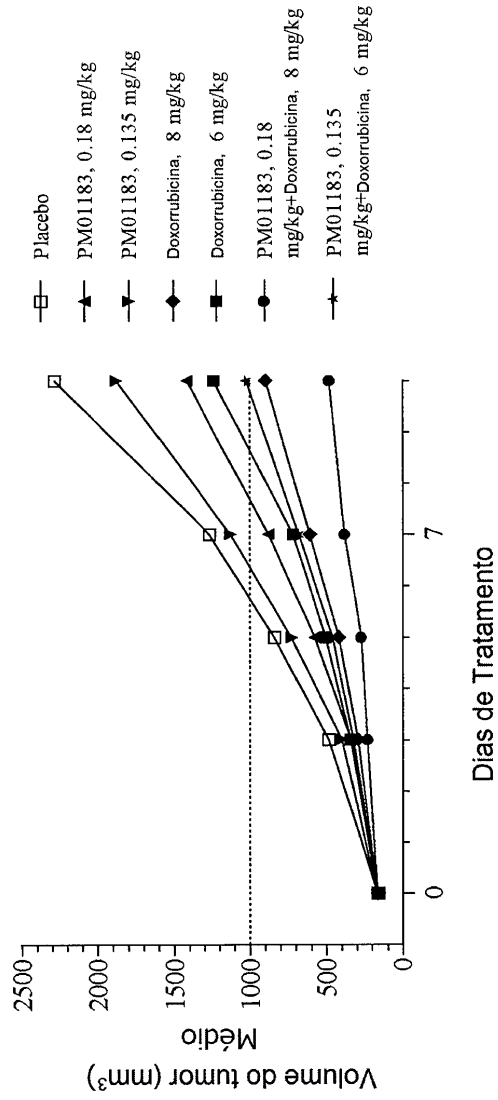


Figura 265

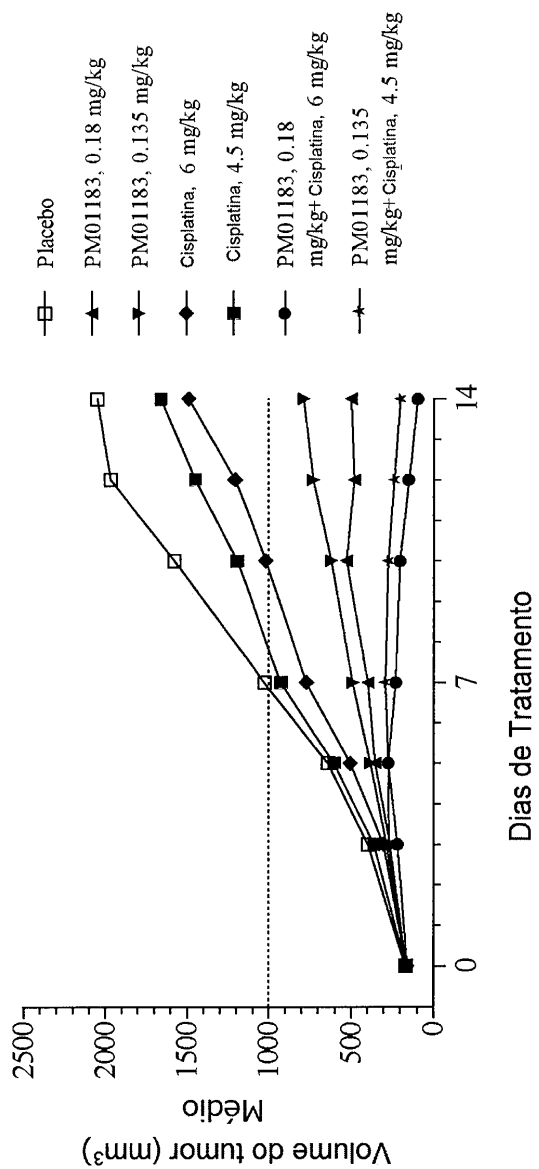


Figura 266

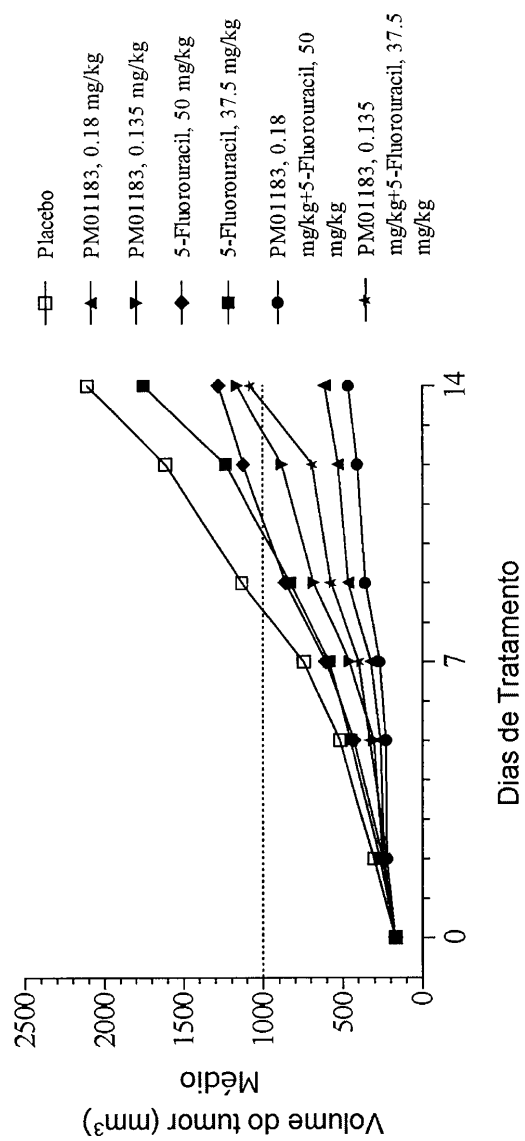


Figura 267

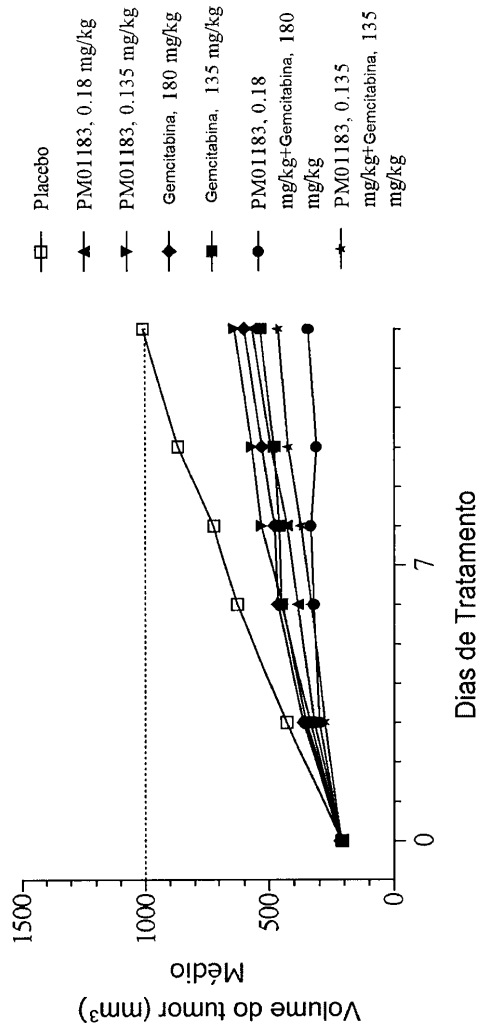


Figura 268

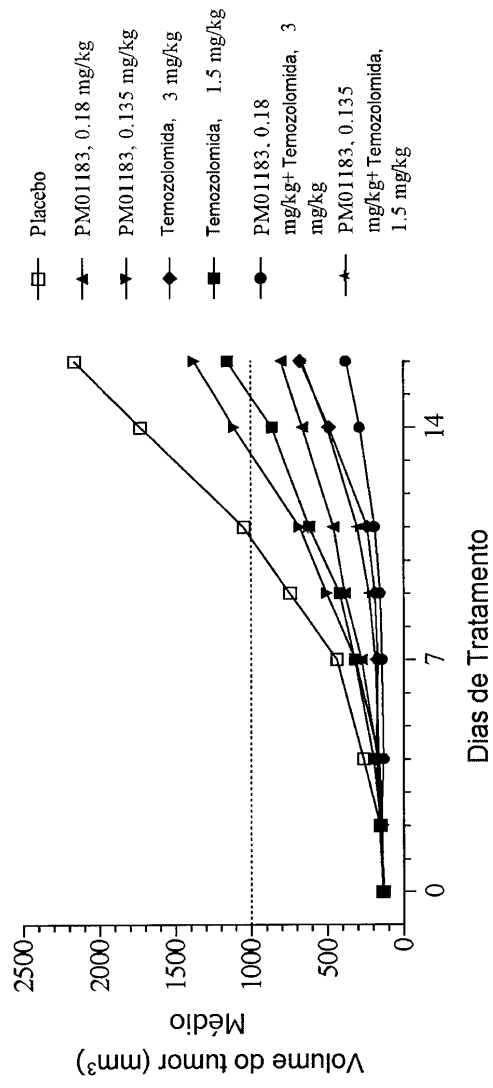


Figura 269

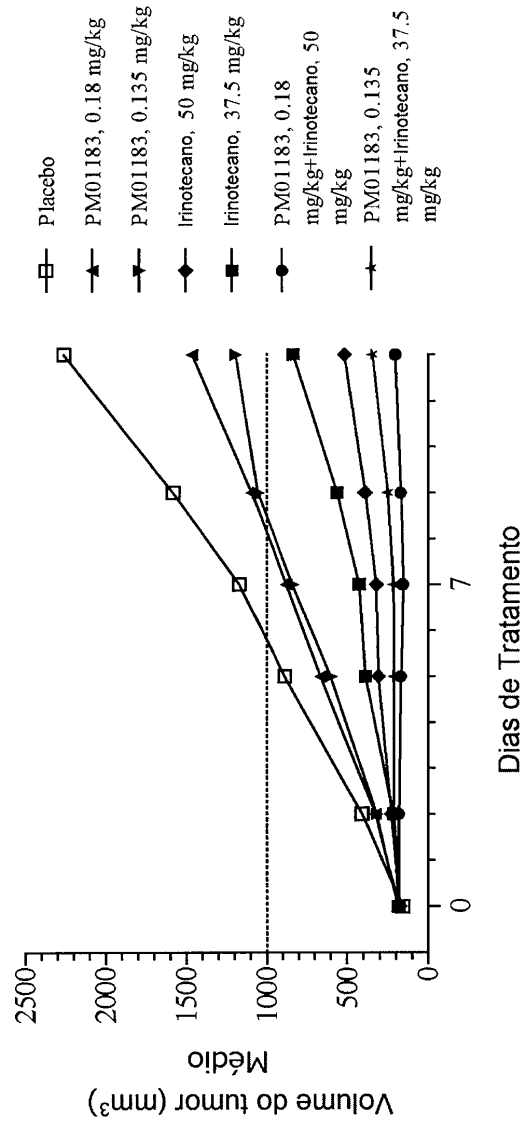


Figura 270

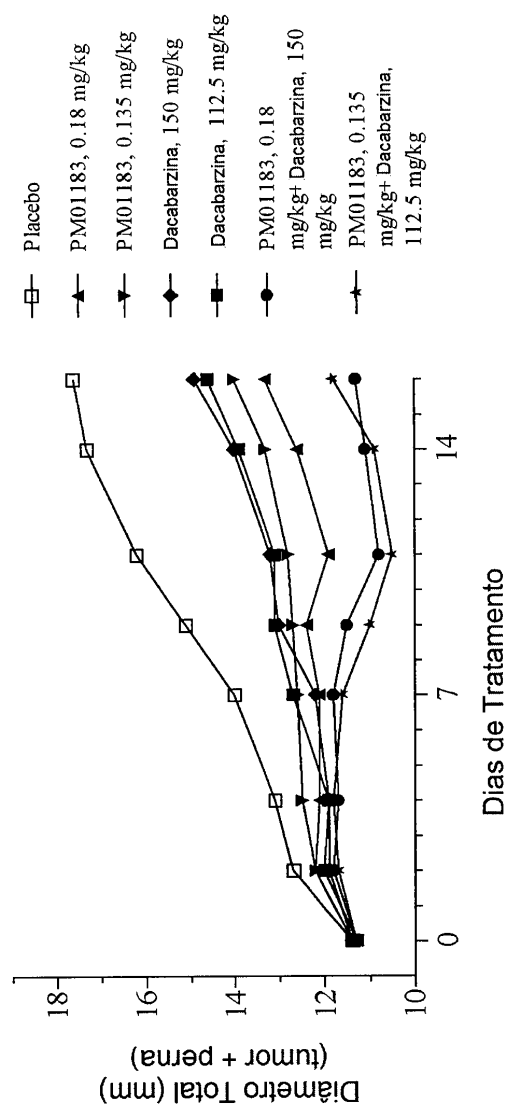


Figura 271

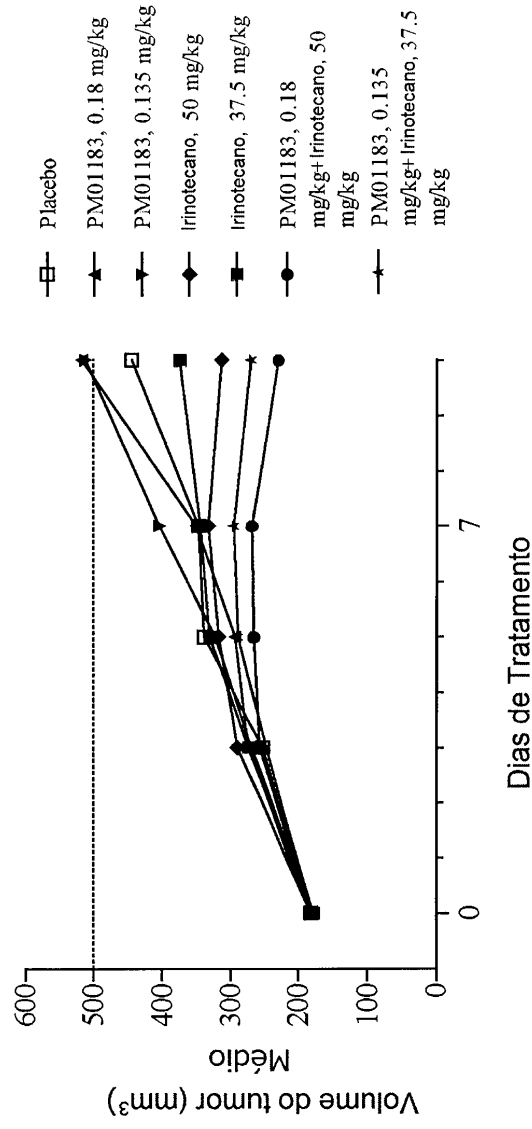


Figura 272

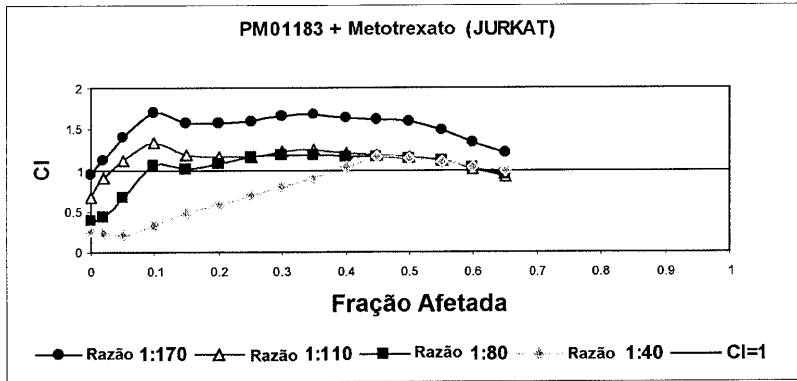


Figura 273

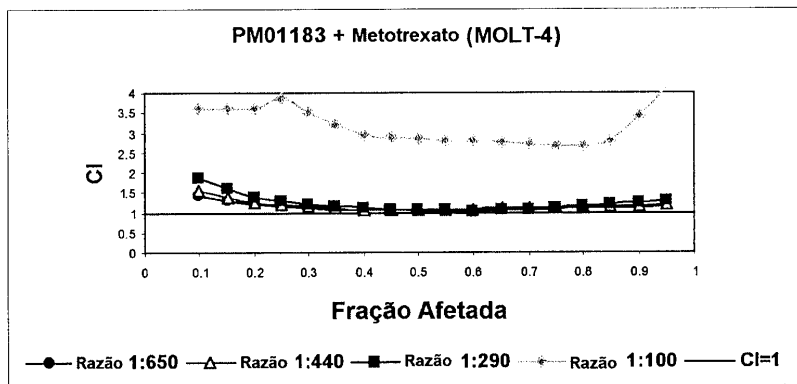


Figura 274

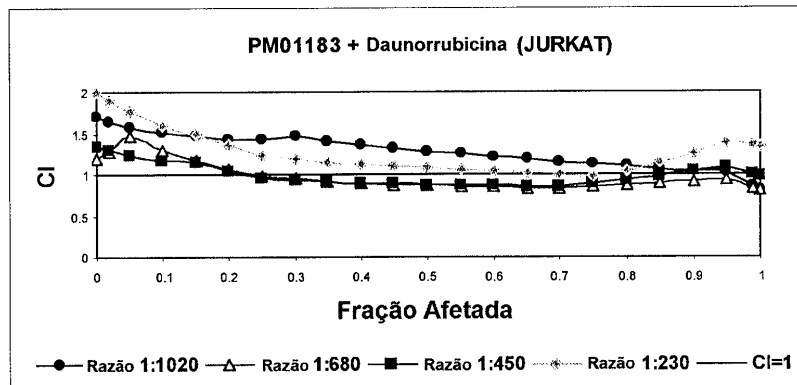


Figura 275

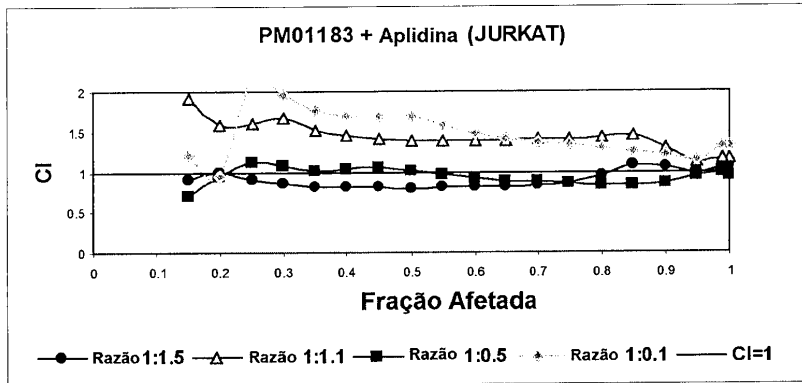


Figura 276

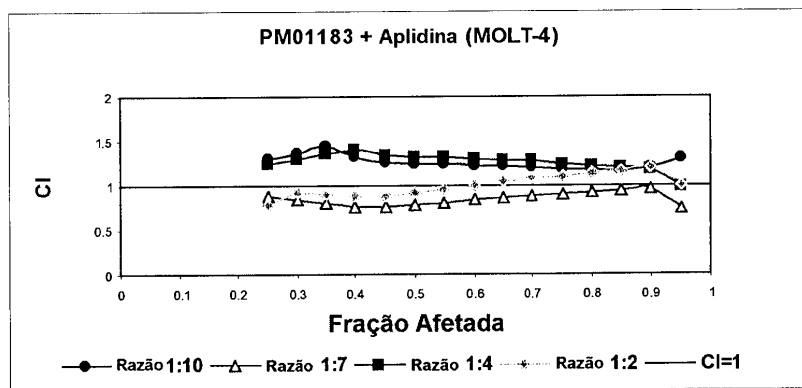


Figura 277

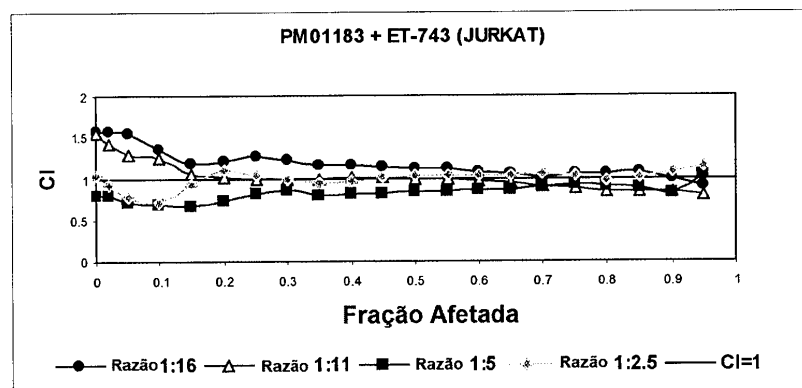


Figura 278

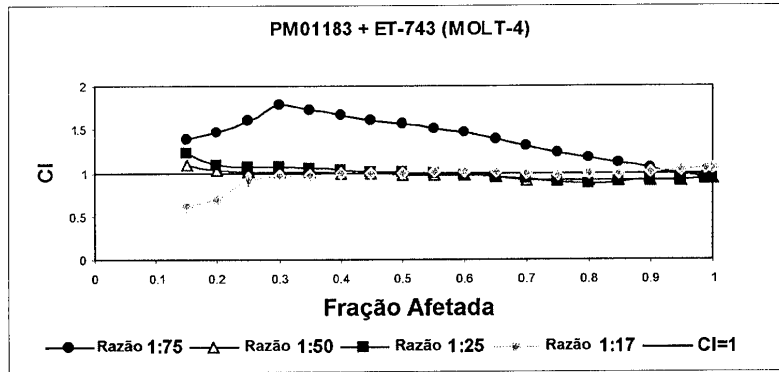


Figura 279

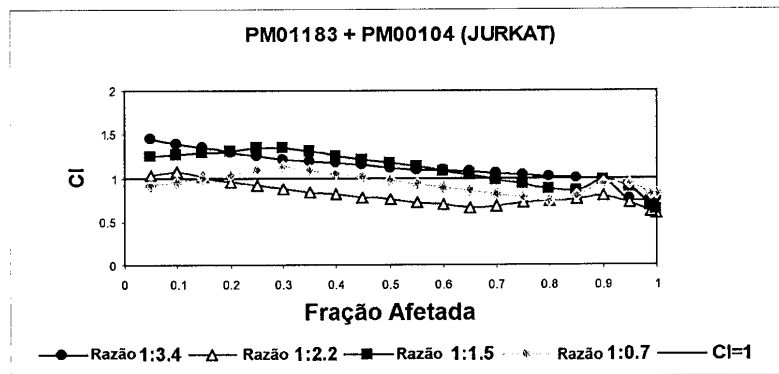


Figura 280

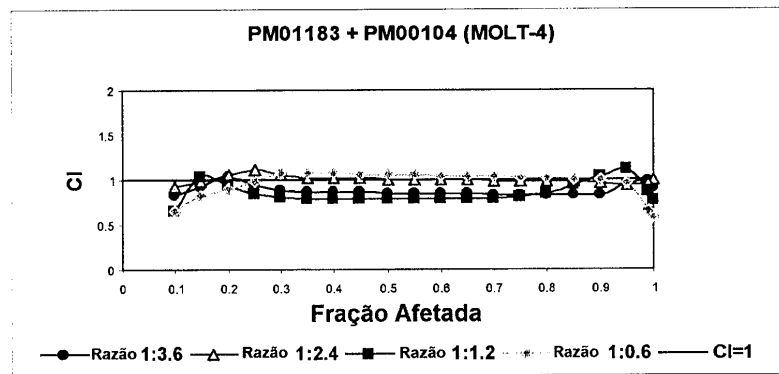


Figura 281

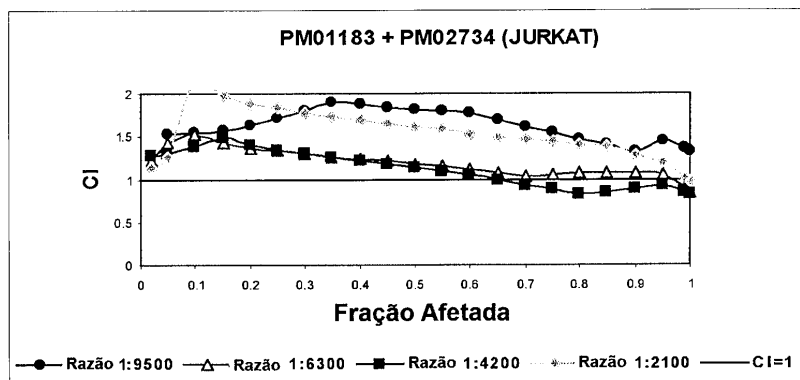


Figura 282

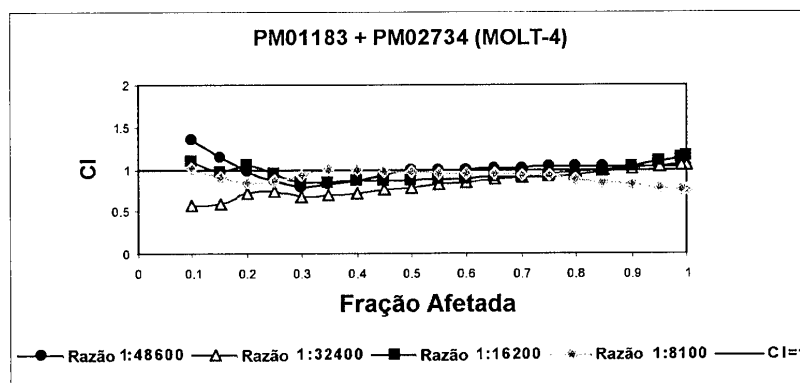


Figura 283

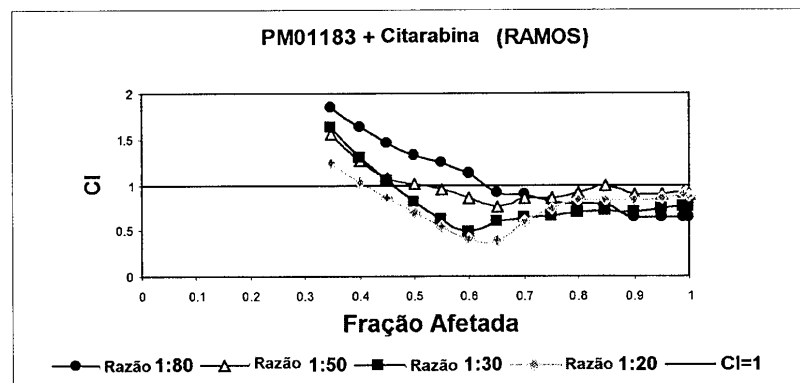


Figura 284

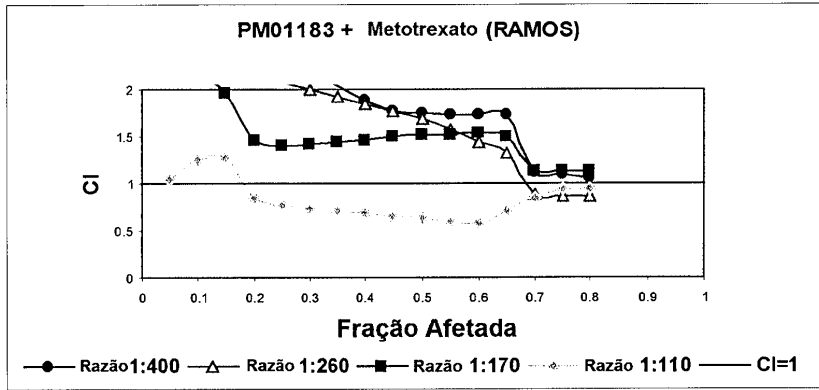


Figura 285

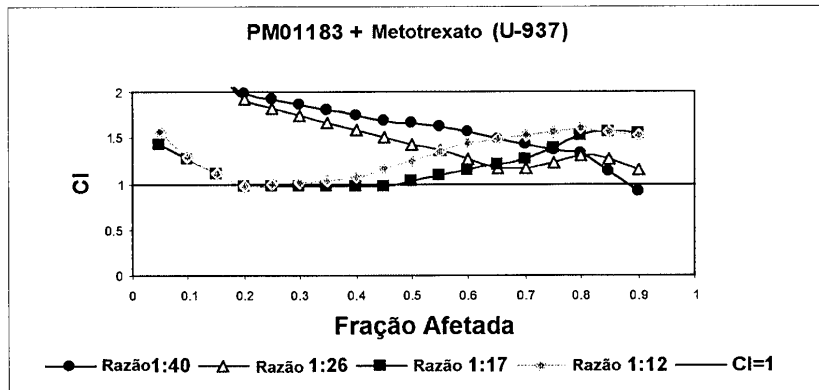


Figura 286

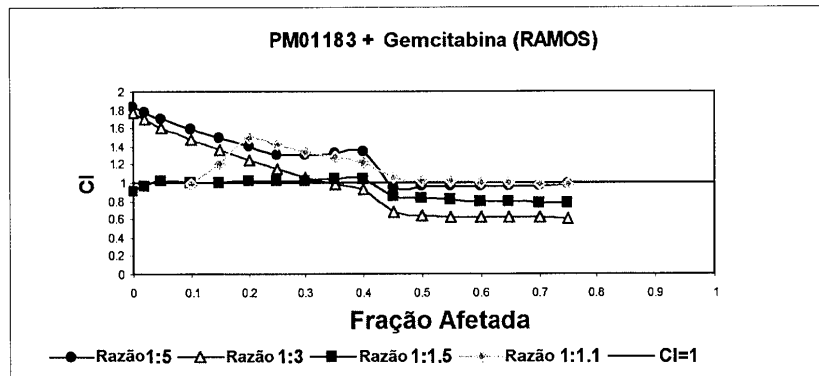


Figura 287

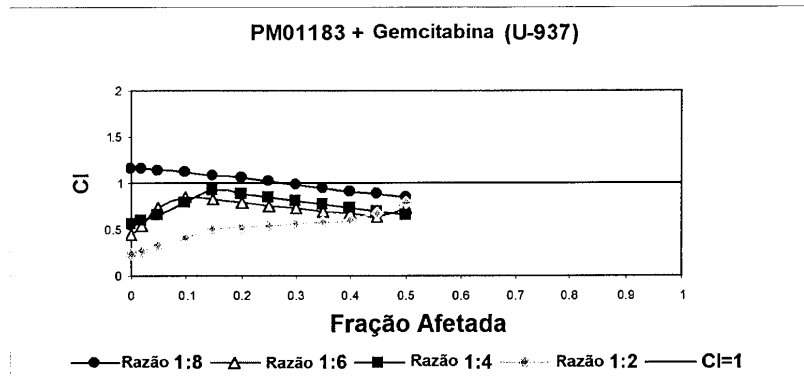


Figura 288

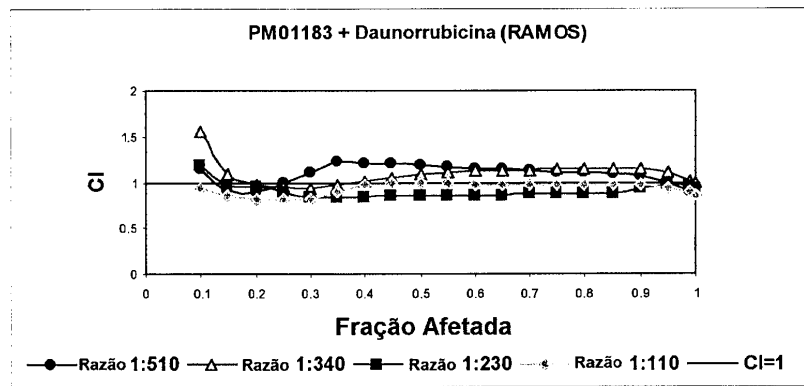


Figura 289

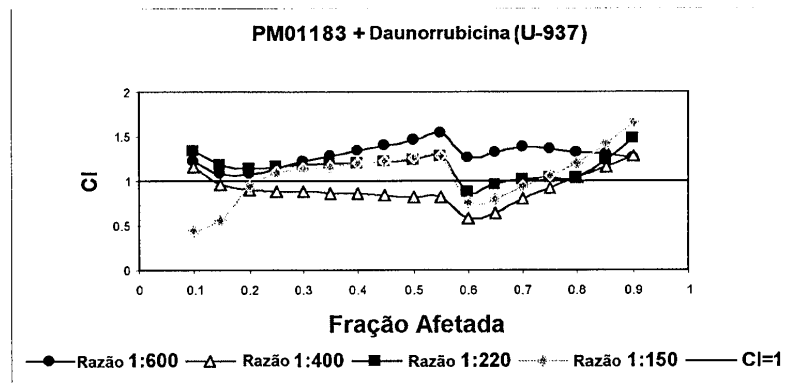


Figura 290

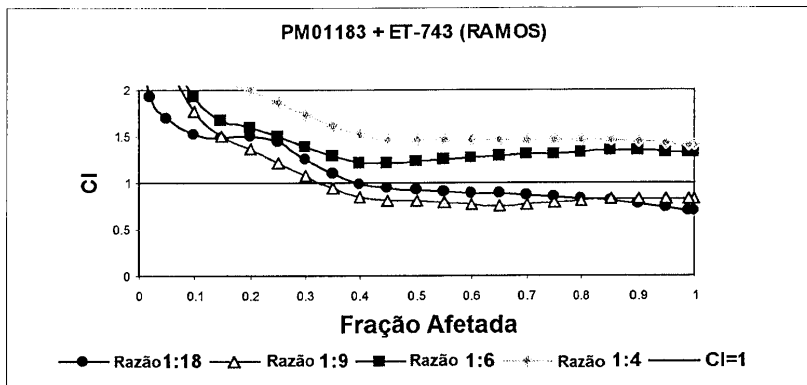


Figura 291

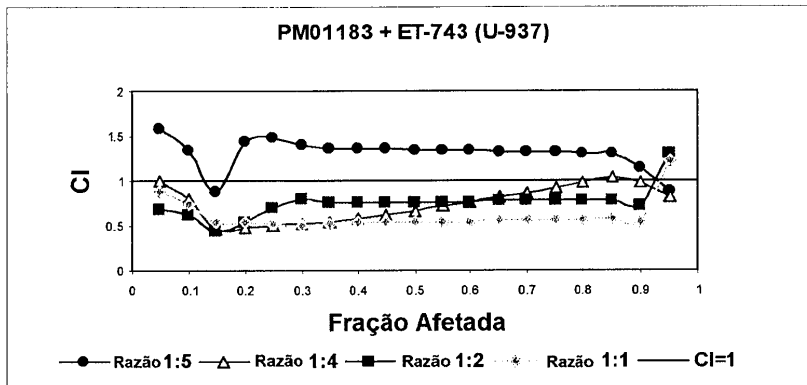


Figura 292

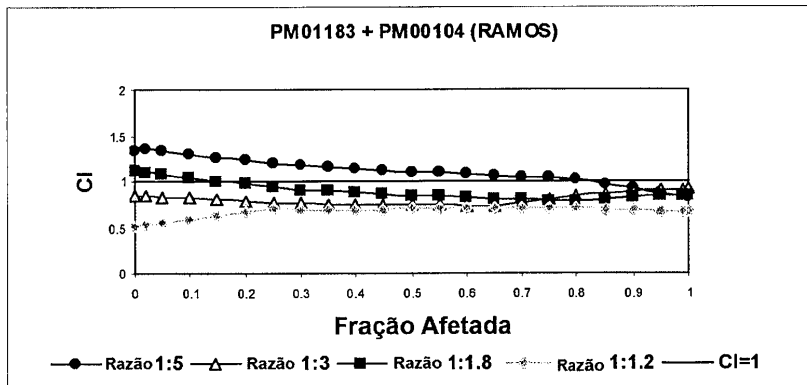


Figura 293

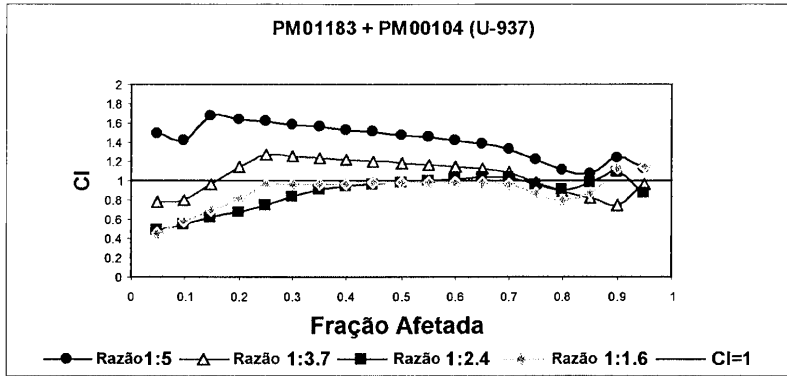


Figura 294

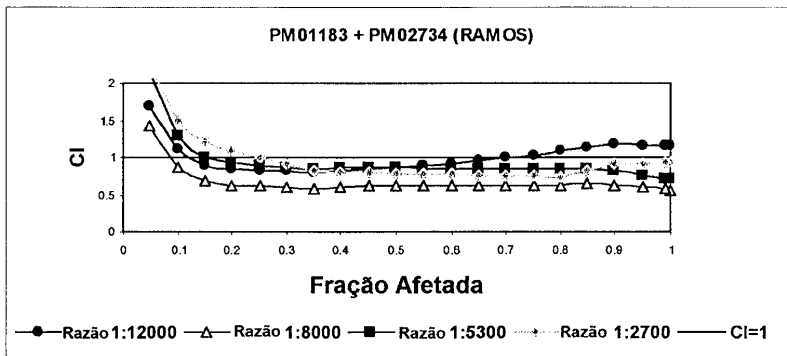


Figura 295

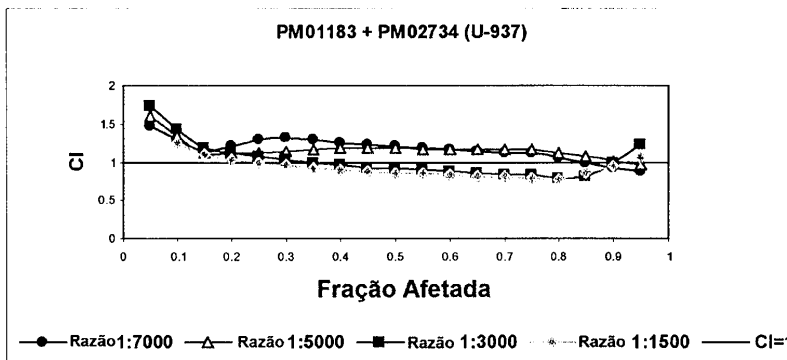


Figura 296