

(11) Número de Publicação: **PT 2097078 E**

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/337** (2014.01) **A61K 39/395** (2014.01)  
**A61K 45/06** (2014.01) **A61P 35/04** (2014.01)  
**A61P 35/00** (2014.01) **A61K 9/00** (2014.01)  
**A61K 9/51** (2014.01) **A61K 31/282** (2014.01)  
**A61K 31/7072** (2014.01) **A61K 33/24**  
(2014.01)

(22) Data de pedido: **2007.11.06**

(30) Prioridade(s): **2006.11.06 US 594417**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.09.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.04.16**  
**141/2014**

(73) Titular(es):

**ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC**  
**11755 WILSHIRE BOULEVARD SUITE 2100 LOS**  
**ANGELES, CA 90025** **US**

(72) Inventor(es):

**PATRICK SOON-SHIONG** **US**  
**NEIL P. DESAI** **US**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **NANOPARTÍCULAS DE PACLITAXEL E ALBUMINA EM COMBINAÇÃO COM BEVACIZUMAB CONTRA O CANCRO**

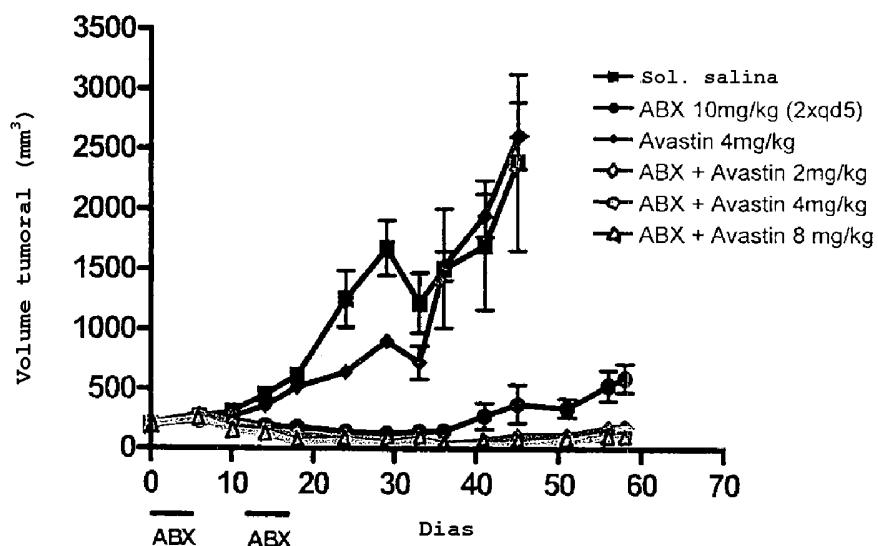
(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS DE TRATAMENTO POR TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE DOENÇAS PROLIFERATIVAS (TAIS COMO O CANCRO) COMPREENDENDO UMA PRIMEIRA TERAPIA COMPREENDENDO A ADMINISTRAÇÃO A UM INDIVÍDUO DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UM TAXANO NUMA COMPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS, E UMA SEGUNDA TERAPIA QUE PODE INCLUIR, POR EXEMPLO, RADIAÇÃO, CIRURGIA, ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS (TAIS COMO UM ANTICORPO ANTI-VEGF), OU SUAS COMBINAÇÕES. TAMBÉM SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO A UM INDIVÍDUO DE UM FÁRMACO DE TAXANO NUMA COMPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS COM BASE NUM REGIME DE DOSAGEM METRONÓMICO.

RESUMO

**"Nanopartículas de paclitaxel e albumina em combinação com bevacizumab contra o cancro"**

A presente invenção proporciona métodos de tratamento por terapia de combinação de doenças proliferativas (tais como o cancro) compreendendo uma primeira terapia compreendendo a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de um taxano numa composição de nanopartículas, e uma segunda terapia que pode incluir, por exemplo, radiação, cirurgia, administração de agentes quimioterapêuticos (tais como um anticorpo anti-VEGF), ou suas combinações. Também são proporcionados métodos de administração a um indivíduo de um fármaco de taxano numa composição de nanopartículas com base num regime de dosagem metronómico.



DESCRIÇÃO

**"Nanopartículas de paclitaxel e albumina em combinação com bevacizumab contra o cancro"**

**CAMPO TÉCNICO**

A presente invenção refere-se a métodos e composições para o tratamento de doenças proliferativas compreendendo a administração de uma combinação de um taxano e pelo menos um outro e outros agentes terapêuticos, assim como outras modalidades de tratamento úteis no tratamento de doenças proliferativas. Em particular, a invenção refere-se à utilização de nanopartículas compreendendo paclitaxel e albumina (tais como Abraxane®) em combinação com outros agentes quimioterapêuticos ou radiação, que pode ser utilizada para o tratamento do cancro.

**ANTERIORIDADE**

A falha de um número significativo de tumores na resposta a terapia com fármacos e/ou de radiação constitui um grave problema no tratamento do cancro. De facto, esta é uma das principais razões porque muitas das formas mais prevalentes de cancro humano ainda resistem a uma intervenção quimioterapêutica eficaz, apesar de certos avanços no campo da quimioterapia.

O cancro é hoje tratado principalmente com um ou uma combinação de três tipos de terapias: cirurgia, radiação e quimioterapia. A cirurgia é uma abordagem tradicional em que a totalidade ou parte de um tumor é removida do corpo. A cirurgia geralmente é apenas eficaz para o tratamento dos estádios iniciais do cancro. Embora a cirurgia seja por vezes eficaz na remoção de tumores localizados em certos locais, por exemplo, na mama, no cólon e na pele, não pode ser utilizada no tratamento de tumores localizados em outras áreas, inacessíveis aos cirurgiões, nem no tratamento de condições neoplásicas disseminadas como a leucemia. Para mais de 50% dos indivíduos com cancro, quando são diagnosticados já não são candidatos a um tratamento cirúrgico eficaz. Os procedimentos cirúrgicos podem aumentar as metástases tumorais através da

circulação sanguínea durante a cirurgia. A maioria dos indivíduos com cancro não more do cancro aquando do diagnóstico ou da cirurgia, mas morre das metástases e da recorrência do cancro.

Outras terapias são também frequentemente ineficazes. A terapia de radiação é apenas eficaz para indivíduos que se apresentam com doença clinicamente localizada em estádios iniciais e médios do cancro, e não é eficaz para os estádios tardios do cancro com metástases. A radiação é geralmente aplicada numa área definida do corpo do indivíduo que contém tecido proliferativo anormal, de modo a maximizar a dose absorvida pelo tecido anormal e minimizar a dose absorvida pelo tecido normal na vizinhança. Contudo, é difícil (se não impossível) administrar selectivamente radiação terapêutica ao tecido anormal. Assim, o tecido normal próximo do tecido anormal é também exposto a doses de radiação potencialmente prejudiciais ao longo do decorrer do tratamento. Existem também alguns tratamentos que requerem exposição de todo o corpo do indivíduo à radiação, num procedimento denominado "irradiação de corpo inteiro" ou "TBI" (do inglês, "*Total Body Irradiation*"). A eficácia das técnicas radioterapêuticas na destruição de células proliferativas anormais é portanto equilibrada por efeitos citotóxicos associados em células normais na vizinhança. Devido a isto, as técnicas de radioterapia têm um índice terapêutico inherentemente estreito que resulta no tratamento inadequado da maioria dos tumores. Mesmo as melhores técnicas radioterapêuticas podem resultar em redução incompleta do tumor, recorrência do tumor, aumento da carga tumoral e indução de tumores resistentes à radiação.

A quimioterapia envolve a ruptura da replicação celular ou do metabolismo celular. A quimioterapia pode ser eficaz, mas tem graves efeitos secundários, e.g., vômitos, diminuição dos glóbulos brancos (WBC, do inglês "*White Blood Cells*"), perda de cabelo, perda de peso e outros efeitos tóxicos. Devido aos efeitos secundários extremamente tóxicos, muitos indivíduos com cancro não conseguem concluir com sucesso um regime de quimioterapia completo. Os efeitos secundários induzidos pela quimioterapia têm um impacto significativo na qualidade de vida do indivíduo e podem influenciar drasticamente a aceitação do tratamento pelo individual.

Adicionalmente, os efeitos secundários adversos associados aos agentes quimioterapêuticos constituem geralmente a principal toxicidade limitante da dose (DLT, do inglês "*Dose-Limiting Toxicidade*") na administração destes fármacos. Por exemplo, a mucosite é uma das principais toxicidades limitantes da dose para vários agentes anticancerosos, incluindo os agentes citotóxicos antimetabolitos 5-FU, metotrexato e antibióticos antitumorais, tais como a doxorrubicina. Muitos destes efeitos secundários induzidos pela quimioterapia, quando graves, podem conduzir à hospitalização, ou requerem tratamento com analgésicos para o tratamento da dor. Alguns indivíduos com cancro morrem da quimioterapia devido a fraca tolerância da quimioterapia. Os efeitos secundários extremos de fármacos anticancerosos são causados pela fraca especificidade relativamente ao alvo destes fármacos. Os fármacos circulam pela maioria dos órgãos normais dos indivíduos assim como pelos tumores pretendidos como alvos. A fraca especificidade para com o alvo que causa efeitos secundários também diminui a eficácia da quimioterapia porque apenas uma fracção dos fármacos é correctamente direcionada. A eficácia da quimioterapia é adicionalmente diminuída pela fraca retenção dos fármacos anticancerosos dentro dos tumores alvo.

Devido à gravidade e amplitude do neoplasma, do tumor e do cancro, existe uma grande necessidade de tratamentos eficazes destas doenças ou desordens que ultrapassem as insuficiências dos tratamentos por cirurgia, quimioterapia e radiação.

### **Problemas dos Agentes Quimioterapêuticos**

O problema da resistência aos fármacos é uma razão da importância acrescida da quimioterapia de combinação, uma vez que a terapia tem que, ao mesmo tempo, evitar a emergência de células resistentes e matar as células preexistentes que são já resistentes ao fármaco.

A resistência aos fármacos é uma denominação dada à circunstância em que uma doença não responde a um fármaco ou fármacos do tratamento. A resistência aos fármacos pode ser intrínseca, o que significa que a doença nunca foi responsiva ao fármaco ou aos fármacos, ou pode ser adquirida, o que

significa que a doença deixa de responder a um fármaco ou fármacos a que a doença anteriormente era respetiva. A resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês "MultiDrug Resistance") é um tipo específico de resistência a fármacos que é caracterizado por resistência cruzada de uma doença a mais do que um fármaco funcional e/ou estruturalmente não relacionados. A resistência a múltiplos fármacos no campo do cancro está discutida com maior detalhe em "Detoxification Mechanisms and Tumor Cell Resistance to Anticancer Drugs", de Kuzmich e Tew, particularmente na secção VII "The Multidrug-Resistant Phenotype (MDR)", *Medical Research Reviews*, Vol. 11, N.º 2, 185-217, (a Secção VII está nas p. 208-213) (1991); e em "Multidrug Resistance and Chemosensitization: Therapeutic Implications for Cancer Chemotherapy", de Georges, Sharom e Ling, *Advances in Pharmacology*, Vol. 21, 185-220 (1990).

Uma forma de resistência a múltiplos fármacos (MDR) é mediada por uma bomba de efluxo ligada à membrana de 170-180 kD dependente da energia designada por glicoproteína P (P-gp). Mostrou-se que a glicoproteína P desempenha um papel importante na resistência intrínseca e adquirida de vários tumores humanos contra fármacos de produtos naturais hidrófobos. Os fármacos que actuam como substratos para, e são consequentemente destoxicificados pela P-gp, incluem os alcalóides de vinca (vincristina e vinblastina), antraciclinas (Adriamicina), e epipodofilotoxinas (etoposido). Embora a MDR associada à P-gp seja um determinante importante na resistência de células tumorais aos agentes quimioterapêuticos, está claro que o fenómeno da MDR é multifactorial e envolve vários mecanismos diferentes.

Uma complicação importante da quimioterapia do cancro e da quimioterapia antiviral são os danos nas células da medula óssea ou a supressão da sua função. Especificamente, a quimioterapia danifica ou destrói células precursoras hematopoiéticas, encontradas principalmente na medula óssea e no baço, prejudicando a produção de novas células sanguíneas (granulócitos, linfócitos, eritrócitos, monócitos, plaquetas, etc.). O tratamento de indivíduos com cancro com 5-fluorouracilo, por exemplo, reduz o número de leucócitos (linfócitos e/ou granulócitos), e pode resultar numa susceptibilidade aumentada dos indivíduos à infecção. Muitos

indivíduos com cancro morrem de infecção ou outras consequências de falha hematopoiética subsequente à quimioterapia. Os agentes quimioterapêuticos podem também resultar numa formação de plaquetas subnormal que produz uma propensidade para hemorragia. A inibição da produção de eritrócitos pode resultar em anemia. Para alguns indivíduos com cancro, o risco de danos no sistema hematopoiético ou em outros tecidos importantes limita frequentemente a oportunidade da escalação da dose de quimioterapia de agentes de quimioterapia para um nível suficientemente elevado para proporcionar uma boa eficácia antitumoral ou antiviral. Ciclos repetidos ou de dose elevada de quimioterapia podem ser responsáveis por uma grave depleção de células estaminais que conduz a sérias sequelas hematopoiéticas de longo prazo e exaustão da medula.

A prevenção de, ou protecção contra, os efeitos secundários da quimioterapia, seria um grande benefício para indivíduos com cancro. Para efeitos secundários potencialmente letais, os esforços concentraram-se na alteração da dose e dos horários do agente quimioterapêutico para reduzir os efeitos secundários. Estão a ficar disponíveis outras opções, tais como a utilização de factor estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF), CSF de granulócito-macrófagos (GM-CSF), factor de crescimento epidérmico (EGF), interleucina 11, eritropoietina, trombopoietina, factor de desenvolvimento e crescimento de megacariócitos, pixiquinas, factor de células estaminais, ligando FLT, assim como interleucinas 1, 3, 6 e 7, para aumentar o número de células normais em vários tecidos antes do início da quimioterapia (Veja-se Jimenez e Yunis, *Cancer Research* 52:413-415; 1992). Os mecanismos de protecção por estes factores, embora não inteiramente entendidos, estão muito provavelmente associados a um aumento no número de células alvo críticas normais antes do tratamento com agentes citotóxicos, e não a uma sobrevivência aumentada das células após a quimioterapia.

### **Direcccionamento de Agentes Quimioterapêuticos para Tratamento de Tumores**

Tanto o crescimento como a metástase de tumores sólidos são dependentes da angiogénese (Folkman, *J. Cancer Res.*, 46, 467-73 (1986); Folkman, *J. Nat. Cancer Inst.*, 82, 4-6 (1989);

Folkman et al., "Tumor Angiogenesis", Chapter 10, pp. 206-32, em The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn et al., eds. (W. B. Saunders, 1995)). Foi mostrado, por exemplo, que tumores que aumentam para mais do que 2 mm de diâmetro têm que obter o seu próprio fornecimento de sangue e fazem-no induzindo o crescimento de novos vasos sanguíneos capilares. Após estes novos vasos sanguíneos ficarem embebidos no tumor, proporcionam nutrientes e factores de crescimento essenciais para o crescimento tumoral assim como um meio para as células tumorais entrarem na circulação e metastatizarem para locais distantes, tais como o fígado, pulmões ou ossos (Weidner, *New Eng. J. Med.*, 324(1), 1-8 (1991)). Quando utilizados como fármacos em animais portadores de tumores, os inibidores da angiogénese naturais podem prevenir o crescimento de tumores pequenos (O'Reilly et al., O'Reilly et al., *Cell*, 79, 315-28 (1994)). De facto, em alguns protocolos, a aplicação destes inibidores conduz à regressão e dormência do tumor mesmo após a cessação do tratamento (O'Reilly et al., *Cell*, 88, 277-85 (1997)). Além disso, o fornecimento de inibidores da angiogénese a certos tumores pode potenciar a sua resposta a outros regimes terapêuticos (e.g., quimioterapia) (veja-se, e.g., Teischer et al., *Int. J. Cancer*, 57, 920-25 (1994)).

As proteína-tirosina-quinases catalisam a fosforilação de resíduos tirosilo específicos em várias proteínas envolvidas na regulação do crescimento e da diferenciação celulares (A.F. Wilks, *Progress in Growth Factor Research*, 1990, 2, 97-111; S.A. Courtneidge, *Dev. Supp.* 1, 1993, 57-64; J.A. Cooper, *Semin. Cell Biol.*, 1994, 5(6), 377-387; R.F. Paulson, *Semin. Immunol.*, 1995, 7(4), 267-277; A.C. Chan, *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, 8(3), 394-401). As proteína-tirosina-quinases podem ser amplamente classificadas como quinases receptoras (e.g. EGFr, c-erbB-2, c-met, tie-2, PDGFr, FGFr) ou não receptoras (e.g. c-src, Ick, Zap70). Foi mostrado que a activação inapropriada ou descontrolada de muitas destas quinases, i.e. actividade de proteína-tirosina-quinase aberrante, por exemplo por sobre-expressão ou mutação, resulta no crescimento celular descontrolado. Por exemplo, uma actividade elevada do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) foi implicada nos cancros do pulmão de células não pequenas, da bexiga e da cabeça e pescoço, e uma actividade aumentada de c-erbB-2 nos cancros da mama,

ovariano, gástrico e pancreático. Assim, a inibição da proteína-tirosina-quinases deverá ser útil como tratamento para tumores tais como os acima referidos.

Os factores de crescimento são substâncias que induzem a proliferação celular, tipicamente por ligação a receptores específicos nas superfícies celulares. O factor de crescimento epidérmico (EGF) induz a proliferação de uma variedade de células *in vivo*, e é necessário para o crescimento da maioria das células em cultura. O receptor do EGF é uma glicoproteína de 170-180 kD que atravessa a membrana, que é detectável numa ampla variedade de tipos de células. O domínio N-terminal extracelular do receptor está altamente glicosilado e liga-se a anticorpos contra o EGF que se ligam selectivamente ao EGFR. Agentes que competitivamente se ligam ao EGFR têm sido utilizados para tratar certos tipos de cancro, uma vez que muitos tumores de origem mesodérmica e ectodérmica sobre-expressam o receptor de EGF. Por exemplo, foi mostrado que o receptor de EGF é sobre-expresso em muitos gliomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas da mama, melanomas, carcinomas invasivos da bexiga e cancros esofágicos. As tentativas para explorar o sistema de EGFR para terapia antitumoral geralmente envolviam a utilização de anticorpos monoclonais contra o EGFR. Em adição, estudos com tumores mamários primários humanos mostraram uma correlação entre a expressão elevada de EGFR e a presença de metástases, superiores taxas de proliferação e mais curta sobrevivência dos indivíduos.

Herlyn *et al.*, na Patente U.S. 5,470,571, divulgam a utilização de Mab 425 radiomarcado para o tratamento de gliomas que expressam EGFR. Herlyn *et al.* reportam que anticorpos anti-EGFR podem, ou estimular ou inibir, o crescimento e a proliferação de células cancerosas. Outros anticorpos monoclonais possuindo especificidade para com o EGFR, seja sozinhos ou conjugados com um composto citotóxico, foram reportados como sendo eficazes para o tratamento de certos tipos de cancro. Bendig *et al.*, em Patente U.S. 5,558,864, divulgam Mab terapêuticos anti-EGFR para a ligação competitiva a EGFR. Heimbrook *et al.*, na Patente U.S. 5,690,928, divulgam a utilização de EGF fundido com uma endotoxina derivada de espécies de *Pseudomonas* para o

tratamento do cancro da bexiga. Brown *et al.*, na Patente U.S. 5,859,018, divulgam um método para o tratamento de doenças caracterizadas por hiperproliferação celular mediada por, *inter alia*, EGF.

### **Modos de Administração de Agentes Quimioterapêuticos**

As pessoas diagnosticadas como possuindo cancro são frequentemente tratadas com agentes quimioterapêuticos únicos ou múltiplos para matar as células cancerosas no local do tumor primário ou em locais distantes para onde o cancro metastatizou. O tratamento de quimioterapia é tipicamente dado numa única, ou em várias doses grandes, ou ao longo de tempos variáveis de semanas a meses. Contudo, ciclos repetidos ou de dose elevada de quimioterapia podem ser responsáveis por toxicidades acrescidas e graves efeitos secundários.

Novos estudos sugerem que a quimioterapia metronómica, a administração de dose baixa e frequente de agentes citotóxicos sem intervalos prolongados sem fármaco, atinge células endoteliais activadas na vasculatura dos tumores. Vários estudos pré-clínicos demonstraram uma superior eficácia antitumoral, potentes efeitos antiangiogénicos e toxicidade e efeitos secundários reduzidos (*e.g.*, mielossupressão) dos regimes metronómicos em comparação com as contrapartidas com a dose máxima tolerada (DMT) (Bocci, *et al.*, *Cancer Res*, 62:6938-6943, (2002); Bocci, *et al.*, *PNAS*, vol, 100(22):12917-12922, (2003); e Bertolini, *et al.*, *Cancer Res*, 63(15):4342-4346, (2003)). Permanece por clarificar se todos os fármacos quimioterapêuticos exercem efeitos similares ou se alguns são mais adequados para estes regimes do que outros. Não obstante, a quimioterapia metronómica parece ser eficaz para ultrapassar alguns dos principais defeitos associados à quimioterapia.

### **Agentes quimioterapêuticos**

Foi mostrado que o paclitaxel possui efeitos antineoplásicos e anticancerosos significativos no cancro ovariano refractário a fármacos e mostrou excelente actividade antitumoral numa ampla variedade de modelos tumorais, e também inibe a angiogénesis quando utilizado em doses muito baixas (Grant *et al.*, *Int. J. Cancer*, 2003). A fraca solubilidade

aqueosa do paclitaxel, contudo, apresenta um problema à administração a seres humanos. De facto, a entrega de fármacos que são inherentemente insolúveis ou fracamente solúveis num meio aquoso pode ser seriamente prejudicada se a entrega oral não for eficaz. Desse modo, as formulações de paclitaxel presentemente utilizadas (e.g., Taxol®) requerem um Cremophor® para solubilizar o fármaco. A presença de Cremophor® nesta formulação foi ligada a graves reacções de hipersensibilidade em animais (Lorenz et al., *Agents Actions* 7:63-67 (1987)) e seres humanos (Weiss et al., *J. Clin. Oncol.* 8:1263-68 (1990)) e consequentemente requer pré-medicação dos indivíduos com corticosteróides (dexametasona) e anti-histamínicos. Foi também reportado que concentrações clinicamente relevantes do veículo de formulação Cremophor® EL no Taxol® anula a actividade antiangiogénica do paclitaxel, sugerindo que este agente ou outros fármacos anticancerosos formulados em Cremophor® EL podem necessitar de ser utilizados em doses muito superiores às que se antecipam para conseguir uma quimioterapia metronómica eficaz (Ng et al., *Cancer Res.*, 64:821-824 (2004)). Como tal, a vantagem da ausência de efeitos secundários indesejáveis associados a regimes de dose baixa de paclitaxel vs. quimioterapia convencional com a DMT pode ficar comprometida. Veja-se também a Patente U.S. com Pub. N.º 2004/0143004; WO00/64437.

**Abraxane® é um paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas isento de Cremophor® EL**

Modelos pré-clínicos apresentaram uma melhoria significativa na segurança e na eficácia do Abraxane® em comparação com o Taxol® (Desai et al., EORTC-NCI-AACR, 2004) e em indivíduos com cancro da mama metastático (O'Shaughnessy et al., *San Antonio Breast Cancer Symposium*, Abstract #1122, Dec. 2003). Isto deve-se possivelmente à ausência de tensioactivos (e.g., Cremophor® ou Tween® 80, utilizados no Taxol® e no Taxotere®, respectivamente) no Abraxane®, e/ou à utilização preferencial de um mecanismo de transporte baseado em albumina que utiliza gp60/cavéolas em células endoteliais microvasculares (Desai et al., EORTC-NCI-AACR, 2004). Em adição, mostrou-se que tanto o Cremophor® como o Tween® 80 inibem fortemente a ligação do paclitaxel a albumina,

possivelmente afectando o transporte baseado na albumina (Desai et al., EORTC-NCI-AACR, 2004).

O IDN5109 (Ortataxel) é um novo taxano, presentemente em Fase II, seleccionado pela sua falta de resistência cruzada em linhas de células tumorais que expressam o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR/Pgp) e inibição de glicoproteína P (Pgp) (Minderman; *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 53:363-9). Devido à sua hidrofobicidade, o IDN5109 é presentemente formulado no tensioactivo Tween® 80 (mesmo veículo que o Taxotere®). A remoção de tensioactivos das formulações de taxano e.g., no caso do paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas (Abraxane®) mostrou melhorias na segurança e na eficácia relativamente às suas contrapartidas contendo tensioactivo (O'Shaughnessy et al., *San Antonio Breast Cancer Symposium*, Abstract #1122, Dec. 2003). O Tween® 80 também inibiu fortemente a ligação do taxano, paclitaxel, a albumina, possivelmente comprometendo o transporte do fármaco baseado em albumina através do receptor gp60 em células endoteliais de microvasos (Desai et al., EORTC-NCI-AACR, 2004).

A actividade antitumoral da colchicina, que é o principal alcalóide do cólquico-do-outono, *Colchicum autumnale*, e do lírio trepador africano, *Gloriosa superba*, foi reportada pela primeira vez no início do século 20. A elucidação da sua estrutura foi finalmente completada a partir de estudos com raios-x e um número de sínteses totais (veja-se Shiau et al., *J. Pharm. Sci.* 1978, 67(3) 394-397). Pensa-se que a colchicina é um veneno mitótico, particularmente em células tímicas, intestinais e hematopoiéticas, que actua como veneno do fuso e bloqueia a cinese. Pensa-se que o seu efeito sobre o fuso mitótico representa um caso especial dos seus efeitos sobre vários sistemas fibrilares lábeis, organizados, relacionados com a estrutura e o movimento.

O dímero IDN5404 de tiocolchicina foi seleccionado pela sua actividade nas sub-linhas ovarianas humanas resistentes a cisplatina e topotecano A2780-CIS e A2780-TOP. O efeito foi relacionado com mecanismos de acção duplos, i.e., actividade nos microtúbulos como nos alcalóides de Vinca e um efeito

inibitório de topoisomerase I diferente da camptotecina. (Raspaglio, *Biochemical Pharmacology* 69:113-121 (2005)).

WO 2006/089290 divulga um método de tratamento de cancro da mama metastático compreendendo a administração de Abraxane® numa quantidade de 100 mg/m<sup>2</sup> em combinação com Carboplatina e Avastin® numa quantidade de 10 mg/m<sup>2</sup>.

WO 2006/090928 refere-se a uma composição farmacêutica para utilização num método de tratamento de cancro e/ou um método para inibição da angiogénese, compreendendo um composto de sulfonamida em combinação com Bevacizumab numa quantidade de 10-6000 mg/dia.

EP 1650220 B1 divulga MAb anti-VEGF e a sua utilização num método de tratamento do cancro, em que o anticorpo anti-VEGF é administrado nas doses de 1 µg/kg a 50 mg/kg.

Verificou-se que composições de nanopartículas de um taxano (tal como paclitaxel ligado a albumina (Abraxane®)) possuem toxicidades significativamente inferiores a outros taxanos como o Taxol® e o Taxotere® com resultados significativamente melhorados tanto em segurança como em eficácia.

Verificou-se que a quimioterapia de combinação, e.g., a combinação de um ou mais agentes quimioterapêuticos ou outros modos de tratamento, e.g., combinação, por exemplo, de quimioterapia com radiação ou cirurgia e quimioterapia, tem mais sucesso do que agentes quimioterapêuticos isoladamente ou modos individuais de tratamento, respectivamente.

Outras referências incluem a Pub. U.S. N.º 2006/0013819; a Pub. U.S. N.º 2006/0003931; WO05/117986; WO05/117978; e WO05/000900.

São necessários tratamentos mais eficazes para doenças proliferativas, especialmente cancro.

#### **BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A invenção proporciona em combinação: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas

compreendendo taxano e uma proteína transportadora, e b) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, para utilização num método de tratamento de um cancro num indivíduo ou para utilização num método de inibição da metástase tumoral num indivíduo, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e até cerca de 10 mg/kg, em que o cancro é melanoma.

Em algumas concretizações, a metástase tumoral é metástase para nódulos linfáticos, ou para o pulmão, ou metástase de cancro da mama.

Em algumas concretizações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é de cerca de 6 mg/kg, cerca de 8 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg.

Em algumas concretizações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> do taxano na composição de nanopartículas, ou em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> do taxano na composição de nanopartículas.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados sequencialmente ao indivíduo.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas é administrada durante pelo menos um ciclo antes da administração do anticorpo anti-VEGF.

Em algumas concretizações, a administração da composição de nanopartículas é seguida pela administração de um anticorpo anti-VEGF durante pelo menos cerca de 3 semanas.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados concorrentemente.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados simultaneamente.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados na mesma composição.

Em algumas concretizações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab.

Em algumas concretizações, o taxano é paclitaxel.

Em algumas concretizações, o diâmetro médio das nanopartículas na composição não é superior a cerca de 200 nm.

Em algumas concretizações, a proteína transportadora é albumina.

Em algumas concretizações, a proteína transportadora é albumina humana ou albumina sérica humana.

Em algumas concretizações, a razão em peso entre a albumina e o taxano na composição de nanopartículas é inferior a cerca de 9:1.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas está isenta de Cremophor.

Em algumas concretizações, a composição de nanopartículas compreende taxano revestido com albumina.

Em algumas concretizações, o indivíduo é humano.

Em algumas concretizações, é inibida pelo menos cerca de 40% ou pelo menos 80% da metástase.

Em algumas variações, as quantidades eficazes da composição de nanopartículas e do anticorpo anti-VEGF inibem sinergicamente a proliferação celular ou a metástase.

Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de

n nanopartículas está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano (e.g., paclitaxel) na composição de nanopartículas é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado semanalmente. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano (e.g., paclitaxel) na composição de nanopartículas é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado de três em três semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é entre, cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 8 mg/kg. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado de duas em duas semanas ou de três em três semanas. Em algumas variações das dosagens e/ou administrações anteriores, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações das dosagens e/ou administrações anteriores, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (Avastin®). Em algumas variações das dosagens e/ou administrações anteriores, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (Avastin®)

Em algumas concretizações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é uma quantidade eficaz para suprimir a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo*. Em algumas variações, a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo* é indução mediada por taxano de VEGF-A. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, a composição compreendendo um taxano é uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano

são nanopartículas compreendendo paclitaxel. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano são nanopartículas compreendendo docetaxel.

Em algumas concretizações, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano (e.g., paclitaxel) na composição é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano é administrado semanalmente. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, o taxano é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano (e.g., paclitaxel) na composição é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano é administrado de três em três semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 5 e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 8 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado de duas em duas semanas ou de três em três semanas. Em algumas variações das dosagens e/ou administrações anteriores, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações das dosagens e/ou administrações anteriores, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (Avastin®). Em algumas variações das dosagens e/ou administrações anteriores, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (Avastin®).

Em algumas variações, a composição compreendendo nanopartículas (também referida como "composição de nanopartículas") e o agente quimioterapêutico são administrados simultaneamente, seja na mesma composição ou em

composições separadas. Em algumas variações, a composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico são administrados sequencialmente, i.e., a composição de nanopartículas é administrada antes ou após a administração do agente quimioterapêutico. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e do agente quimioterapêutico são concorrentes, i.e., o período de administração da composição de nanopartículas e o do agente quimioterapêutico sobrepõem-se com à outra. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e do agente quimioterapêutico não são concorrentes. Por exemplo, em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas é terminada antes de o agente quimioterapêutico ser administrado. Em algumas variações, a administração do agente quimioterapêutico é terminada antes de a composição de nanopartículas ser administrada.

Em algumas variações, o taxano da primeira terapia é paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas, descrito, por exemplo, na Patente U.S. 6,566,405, e comercialmente disponível com a denominação comercial Abraxane®. Em adição, é também concebido que o taxano da primeira terapia seja docetaxel ligado a albumina em nanopartículas descrito por exemplo no pedido de Patente U.S. com Publicação n.º 2005/0004002A1. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (i.e., Avastin®).

A presente invenção também proporciona regimes de terapia metronómica. Em algumas variações, o método compreende a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), em que a composição de nanopartículas é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25% a cerca de 25% da sua dose máxima tolerada seguindo um regime de dosagem tradicional. Em algumas variações, o método compreende a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tais como o Abraxane®), em que a composição de nanopartículas é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada

administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose de paclitaxel em cada administração é cerca de 0,25% a cerca de 25% da sua dose máxima tolerada seguindo um regime de dosagem tradicional. Em algumas variações, a dose do taxano (tal como paclitaxel, por exemplo Abraxane<sup>®</sup>) por administração é inferior a cerca de qualquer de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 18%, 20%, 22%, 24%, ou 25% da dose máxima tolerada. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada pelo menos cerca de qualquer de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x (*i.e.*, diariamente) por semana. Em algumas variações, os intervalos entre cada administração são inferiores a cerca de qualquer de 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias e 1 dia. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada ao longo de um período de pelo menos cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 e 36 meses.

Em algumas variações, o método compreende a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), em que o taxano é administrado ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 25 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o método compreende a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tais como o Abraxane<sup>®</sup>) e uma proteína transportadora (tal como albumina), em que o paclitaxel é administrado ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 25 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, a dose do taxano (tal como paclitaxel, por exemplo Abraxane<sup>®</sup>) por administração é inferior a cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 22 e 25 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada pelo menos cerca de qualquer de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x (*i.e.*, diariamente) por semana. Em algumas variações, os intervalos entre cada administração são inferiores a cerca de qualquer de 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias e 1 dia. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada ao longo de um

período de pelo menos cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 e 36 meses.

Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, a composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, a razão em peso entre a albumina e o paclitaxel na composição é cerca de 18:1 ou inferior, tal como cerca de 9:1 ou inferior. Em algumas variações, o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e a composição de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e o paclitaxel está revestido com albumina. Outras combinações das características anteriores estão também contempladas. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é Abraxane®. As composições de nanopartícula compreendendo outros taxanos (tais como docetaxel e ortataxel) podem também compreender uma ou mais das características anteriores.

Numa concretização preferida, a combinação da invenção destina-se a utilização num método de inibição da metástase tumoral num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de: a) de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano e uma proteína transportadora, e b) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, é proporcionado um método de inibição da metástase tumoral num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: (1) de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um taxano, e (2) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, em que a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é uma quantidade eficaz para suprimir a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo*. Em algumas variações, a

composição compreendendo o taxano é uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora.

Em algumas variações, a metástase tumoral é metástase para os nódulos linfáticos. Em algumas variações, a metástase tumoral é metástase para o pulmão. Em algumas variações, a metástase tumoral é metástase de cancro da mama. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab. Em algumas variações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é cerca de 6 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é cerca de 8 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> do taxano na composição de nanopartículas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> do taxano na composição de nanopartículas. Em algumas variações, a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados sequencialmente ao indivíduo. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada durante pelo menos um ciclo antes da administração do anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas é seguida pela administração de um anticorpo anti-VEGF durante pelo menos cerca de 3 semanas. Em algumas variações, o método compreende a administração do taxano numa composição de nanopartículas concorrente com a administração de anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o diâmetro médio das nanopartículas na composição não é superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, a razão em peso entre a albumina e o taxano na composição de nanopartículas é inferior a cerca de 9:1. Em algumas variações, a composição de nanopartículas está isenta de Cremophor. Em algumas variações, o indivíduo é humano. Em algumas variações, é inibida pelo menos cerca de 40% da metástase. Em algumas variações, é inibida pelo menos cerca de 80% da metástase.

Estes e outros aspectos e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada subsequente e das reivindicações anexas.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1A mostra o efeito de ABI-007 sobre a angiogéneses em anéis aórticos de rato. A Figura 1B mostra o efeito de ABI-007 sobre a proliferação de células endoteliais humanas. A Figura 1C mostra o efeito de ABI-007 sobre a formação de tubos de células endoteliais.

A Figura 2 mostra a determinação de uma dose biológica óptima de ABI-007 para dosagem metronómica. São mostrados os níveis de progenitores endoteliais circulantes (CEP) viáveis em sangue periférico de ratinhos Balb/cJ em resposta a doses crescentes de ABI-007. Não Tratado, controlo não tratado; S/A, controlo de veículo de sol. salina/albumina. Barras, média ± EP. \* Significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente do controlo não tratado.

As Figuras 3A e 3B mostram os efeitos de ABI-007 e Taxol® utilizados em regimes metronómicos ou na DMT sobre o crescimento de tumores MDA-MB-231 (A) e PC3 (B) em ratinhos SCID portadores de tumores. As Figuras 3C e 3D mostram os efeitos de ABI-007 e Taxol® utilizados em regimes metronómicos ou na DMT sobre o peso corporal de ratinhos SCID portadores de tumores MDA-MB-231 (C) e PC3 (D).

As Figuras 4A e 4B mostram as alterações nos níveis de progenitores endoteliais circulantes (CEP) viáveis em sangue periférico de ratinhos SCID portadores de tumores MDA-MB-231 (Fig. 4A) e PC3 (Fig. 4B) após tratamento com A, sol. salina/albumina; B, controlo de Cremophor EL; C, Taxol® metronómico a 1,3 mg/kg; D, E, e F, ABI-007 metronómico a 3, 6 e 10 mg/kg, respectivamente; G, Taxol® na DMT; H, ABI-007 na DMT. Barras, média ± EP. <sup>a</sup> Significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente do controlo de veículo com sol. salina/albumina. <sup>b</sup>Significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente do controlo de veículo com Cremophor EL.

A Figura 5A mostra a densidade de microvasos intratumoriais de xenoenxertos de MDA-MB-231 ( ) e PC3 ( ) tratados com A, sol. salina/albumina; B, controlo de Cremophor EL; C, Taxol® metronómico a 1,3 mg/kg; D, E, e F,

ABI-007 metronómico a 3, 6, e 10 mg/kg, respectivamente; G, Taxol na DMT; H, ABI-007 na DMT. Barras, média ± EP. As Figuras 5B e 5C mostram a correlação entre densidade de microvasos intratumorais e o número de CEP viáveis em sangue periférico em ratinhos SCID portadores de tumores MDA-MB-231 (Fig. 5B) e PC3 (Fig. 5C).

A Figura 6 mostra os efeitos de ABI-007 ou Taxol utilizados em regimes metronómicos ou na DMT sobre a angiogénesse induzida por factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) em rolhões de matrigel injectados subcutaneamente nos flancos de ratinhos Balb/cJ. Tratamentos - A, sol. salina/albumina; B, controlo de Cremophor EL; C, Taxol metronómico a 1,3 mg/kg; D, E, e F, ABI-007 metronómico a 3, 6 e 10 mg/kg, respectivamente; G, Taxol na DMT; H, ABI-007 na DMT. Matrigel implantado sem bFGF (-bFGF) serviu como controlo negativo. Barras, média ± EP.

A Figura 7A e a Figura 7B mostram a actividade citotóxica de nab-rapamicina em combinação com Abraxane® sobre células do músculo liso vascular. A citotoxicidade foi avaliada por coloração com homodímero-1 de etídio (Fig. 7A) ou por coloração com calceína (Fig. 7B).

A Figura 8 mostra a actividade citotóxica de nab-rapamicina em combinação com Abraxane® num modelo de xenoenxerto de carcinoma do cólon humano HT29.

A Figura 9 mostra a actividade citotóxica de nab-17-AAG em combinação com Abraxane® num modelo de xenoenxerto de carcinoma pulmonar humano H358.

As Figuras 10A e 10B mostram a necrose em células tumorais MDA-MB-231 após tratamento com controlo de sol. salina ou Abraxane®. As Figuras 10C e 10D mostram hipoxia em células MDA-MB-231 após tratamento com controlo de sol. salina ou Abraxane®. As setas indicam locais de necrose (10A e 10B) ou locais de hipoxia (10C e 10D).

As Figuras 11A e 11B mostram o efeito de VEGF-A e Avastin® sobre células tratadas com Abraxane® em ensaios de citotoxicidade e clonogénicos. Na Fig. 11A, os resultados

estão apresentados como células viáveis em percentagem de células não tratadas. Os círculos a negro indicam células tratadas com Abraxane® apenas; os círculos a branco indicam células tratadas com Abraxane® e VEGF-A; os triângulos a negro indicam células tratadas com Abraxane® e Avastin®. Na Fig. 11B, os resultados estão apresentados como o número médio de colónias de células por placa.

A Figura 12 mostra o efeito do tratamento com Abraxane® e Avastin® sobre o crescimento de xenoenxertos de tumor da mama MDA-MB-231. Os quadrados a negro indicam o volume tumoral médio em ratinhos tratados com sol. salina; os círculos a negro indicam o volume tumoral médio em ratinhos tratados com Abraxane®; os losangos a negro indicam o volume tumoral médio em ratinhos tratados com Avastin®; os losangos a branco indicam o volume tumoral médio em ratinhos tratados com Abraxane® + Avastin® (2 mg/kg); os círculos a branco indicam o volume tumoral médio em ratinhos tratados com Abraxane® + Avastin® (4 mg/kg); os triângulos indicam o volume tumoral médio em ratinhos tratados com Abraxane® + Avastin® (8 mg/kg). As duas barras rotuladas com ABX indicam os dois ciclos de tratamento com Abraxane®.

As Figuras 13A e 13B mostram o efeito do tratamento com Abraxane® e Avastin® sobre a metástase de células tumorais MDA-MB-231 que expressam luciferase, para os nódulos linfáticos e para os pulmões, em ratinhos portadores de tumores. Os resultados estão apresentados como os níveis de actividade de luciferase em extractos celulares dos nódulos linfáticos ou dos pulmões.

A Figura 14 mostra o efeito de formulações de paclitaxel à base de solvente (*i.e.*, Taxol®) e sem solvente (*i.e.*, nab-paclitaxel, Abraxane®) sobre o volume tumoral (Fig. 14A) e angiogénesis reacional (Fig. 14B) em xenoenxertos sensíveis ao paclitaxel (MX-1 e MES-SA) e resistentes ao paclitaxel (MES-SA/Dx5).

A Figura 15 mostra que a administração de Avastin® em combinação com Abraxane® a ratinhos portadores de xenoenxertos de cancro da mama humano MDA-MS-231 melhora significativamente a supressão tumoral induzida por Abraxane® sozinho.

A Figura 16 mostra que a terapia de combinação com Abraxane® e Avastin®, mas não com Abraxane® ou Avastin® sozinhos, resultou em regressões tumorais sustentáveis em todos os ratinhos tratados durante pelo menos 95 dias após a implantação do tumor.

A Figura 17 mostra que a terapia de combinação com Abraxane® e Avastin®, mas não com Abraxane® ou Avastin® sozinhos, resultou em inibição da metástase linfática (Fig. 17A) e pulmonar (Fig. 17B).

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

A presente invenção refere-se genericamente a terapia de combinação compreendendo uma primeira terapia compreendendo a administração de nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), tal como Abraxane®, em conjunto com uma segunda terapia tal como a administração de pelo menos um outro agente quimioterapêutico, para o tratamento de uma doença proliferativa ou metástase. A invenção também proporciona métodos de terapia metronómica.

De acordo com a invenção, um anticorpo anti-VEGF é um segundo agente quimioterapêutico obrigatório presente na combinação numa quantidade superior a 1 mg/kg e até cerca de 10 mg/kg. Adicionalmente, de acordo com a invenção, o taxano está presente nas nanopartículas numa quantidade entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup>. De acordo com a invenção, a doença proliferativa é melanoma. O melanoma pode ser primário ou metastático (ou seja, melanoma que metastatizou a partir do melanoma primário). A combinação da invenção pode ser utilizada para o tratamento de estádios avançados de melanoma.

A presente invenção envolve a verificação de que o Abraxane®, devido à sua actividade antitumoral superior e toxicidade e efeitos secundários reduzidos, pode ser administrado em combinação com outros fármacos terapêuticos e/ou modalidades de tratamento e pode também ser utilizado em quimioterapia metronómica. Devido a perfis de segurança significativamente melhorados com composições compreendendo nanopartículas de fármaco/proteína transportadora (tais como o

Abraxane<sup>®</sup>), acreditamos que a quimioterapia de combinação com estas composições de nanopartículas (tais como o Abraxane<sup>®</sup>) é mais eficaz do que a quimioterapia de combinação com outros fármacos. Em adição, acredita-se também que a utilização de uma composição de nanopartículas (tal como o Abraxane<sup>®</sup>) em combinação com radiação é mais eficaz do que a combinação de outros agentes com radiação. Assim, as composições de nanopartículas (especialmente uma composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina, tal como o Abraxane<sup>®</sup>), quando utilizadas em combinação com outros agentes quimioterapêuticos ou quando combinadas com outras modalidades de tratamento, deverá ser muito eficaz e ultrapassar as deficiências da cirurgia, do tratamento com radiação e da quimioterapia, no tratamento de uma doença proliferativa (tal como o cancro).

De acordo com a invenção, a primeira terapia compreendendo um taxano e a segunda terapia podem ser administradas a um mamífero possuindo a doença proliferativa sequencialmente, ou podem ser co-administradas, e mesmo administradas simultaneamente na mesma composição farmacêutica.

Adicionalmente, verificou-se que um regime de dosagem metronómica utilizando Abraxane<sup>®</sup> é mais eficaz do que o esquema de dosagem tradicional com a DMT da mesma composição de fármacos. Verificou-se que este regime de dosagem metronómica de Abraxane<sup>®</sup> é mais eficaz do que a dosagem metronómica de Taxol<sup>®</sup>.

Como aqui se utiliza, "tratamento" é uma abordagem para obtenção de resultados clínicos benéficos ou desejados. Para os fins da presente invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não se lhes limitando, qualquer um ou mais de: alívio de um ou mais sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (*i.e.*, sem agravamento), prevenção ou retardação da disseminação (*e.g.*, metástase) da doença, prevenção ou retardação da ocorrência ou recorrência da doença, retardação ou abrandamento da progressão da doença, melhoria do estado da doença, e remissão (seja parcial ou total). Também é abrangida por "tratamento" uma redução da consequência patológica de uma doença

proliferativa. Os métodos da invenção contemplam qualquer um ou mais destes aspectos de tratamento.

Como aqui se utiliza, uma "doença proliferativa" é definida como uma doença tumoral (incluindo benigna ou cancerosa) e/ou quaisquer metástases, onde quer que o tumor ou a metástase estejam localizados, mais especialmente um tumor seleccionado entre o grupo que compreende um ou mais de (e em algumas variações seleccionadas do grupo que consiste em) cancro da mama, cancro genito-urinário, cancro do pulmão, cancro gastrointestinal, cancro epidermóide, melanoma, cancro ovariano, cancro pancreático, neuroblastoma, cancro colorrectal, cancro da cabeça e pescoço. Num sentido mais lato da invenção, uma doença proliferativa pode adicionalmente ser seleccionada entre condições hiperproliferativas tais como hiperplasias, fibrose (especialmente pulmonar, mas também outros tipos de fibrose, tais como fibrose renal), angiogénesis, psoriase, aterosclerose e proliferação do músculo liso nos vasos sanguíneos, tal como estenose ou restenose após angioplastia. Em algumas variações, a doença proliferativa é cancro. Em algumas variações, a doença proliferativa é uma doença não cancerosa. Em algumas variações, a doença proliferativa é um tumor benigno ou maligno. Onde adiante e subsequentemente sejam mencionados um tumor, uma doença tumoral, um carcinoma ou um cancro, também está implicada metástase no órgão ou tecido originais e/ou, alternativamente ou em adição, em qualquer outra localização, qualquer que seja a localização do tumor e/ou da metástase.

A expressão "quantidade eficaz", aqui utilizada, refere-se a uma quantidade de um composto ou composição suficiente para tratar uma desordem, condição ou doença especificadas tal como melhorar, paliar, diminuir e/ou retardar um ou mais dos seus sintomas. Com referência aos cancros ou outra proliferação celular indesejada, uma quantidade eficaz compreende uma quantidade suficiente para fazer com que um tumor diminua e/ou para diminuir a velocidade de crescimento do tumor (tal como para suprimir o crescimento tumoral) ou para prevenir ou retardar outra proliferação celular indesejada. Em algumas variações, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para retardar o desenvolvimento. Em algumas variações, uma quantidade eficaz é

uma quantidade suficiente para prevenir ou retardar a ocorrência e/ou recorrência. Uma quantidade eficaz pode ser administrada numa ou mais administrações. No caso do cancro, a quantidade eficaz do fármaco ou da composição pode: (i) reduzir o número de células cancerosas; (ii) reduzir a dimensão do tumor; (iii) inibir, retardar, abrandar em alguma extensão e preferivelmente parar a infiltração de células cancerosas nos órgãos periféricos; (iv) inibir (*i.e.*, abrandar em alguma extensão e preferivelmente parar) a metástase tumoral; (v) inibir o crescimento tumoral; (vi) prevenir ou retardar a ocorrência e/ou recorrência de tumor; e/ou (vii) aliviar em alguma extensão um ou mais dos sintomas associados ao cancro.

É aqui divulgado para referência um método de tratamento de cancro da mama (que pode ser positivo para HER2 ou negativo para HER2), incluindo, por exemplo, cancro da mama avançado, cancro da mama em estádio IV, cancro da mama localmente avançado e cancro da mama metastático. É aqui adicionalmente divulgado, para referência, um método de tratamento de cancro do pulmão, incluindo, por exemplo, cancro do pulmão de células não pequenas (CPCNP, tal como CPCNP avançado), cancro do pulmão de células pequenas (CPCP, tal como CPCP avançado), e malignidade de tumor sólido avançada no pulmão. É aqui adicionalmente descrito um método de tratamento de qualquer um entre cancro ovariano, cancro da cabeça e pescoço, malignidades gástricas, cancro colorrectal, cancro pancreático e tumores sólidos (tais como tumores sólidos avançados). Em algumas variações, a proliferação celular e/ou a migração celular são reduzidas. É também divulgado o tratamento de qualquer das seguintes doenças: restenose, estenose, fibrose, angiogénesis, psoriase, aterosclerose e proliferação de células do músculo liso, assim como a retardação do desenvolvimento de qualquer das doenças proliferativas.

O termo "indivíduo" é um mamífero, incluindo seres humanos. Um indivíduo inclui, mas não se lhes limita, seres humanos, bovinos, cavalos, felinos, caninos, roedores ou primatas. Em algumas variações o indivíduo é humano. O indivíduo (tal como o ser humano) pode ter doença avançada ou menor extensão da doença, tal como fraca carga tumoral. Em algumas variações, o indivíduo está num estágio inicial de uma

doença proliferativa (tal como cancro). Em algumas variações, o indivíduo está num estádio avançado de uma doença proliferativa (tal como um cancro avançado). Em algumas variações, o indivíduo é positivo para HER2. Em algumas variações, o indivíduo é negativo para HER2.

Os métodos podem ser praticados num cenário de adjuvante. Um "cenário de adjuvante" refere-se a uma cenário clínico em que um indivíduo tem um historial de uma doença proliferativa, particularmente cancro, e geralmente (mas não necessariamente) foi responsivo a terapia, o que inclui, mas não se lhes limita, cirurgia (tal como ressecção cirúrgica), radioterapia e quimioterapia. Contudo, devido ao seu historial de doença proliferativa (tal como cancro), estes indivíduos são considerados em risco de desenvolvimento da doença. O tratamento ou administração no "cenário de adjuvante" refere-se a um modo subsequente de tratamento. O grau de risco (*i.e.*, quando um indivíduo no cenário de adjuvante é considerado em "alto risco" ou "baixo risco") depende de vários factores, mais usualmente da extensão da doença quando é tratada pela primeira vez. Os métodos aqui proporcionados podem também ser praticados num cenário de neo-adjuvante, *i.e.*, o método pode ser realizado antes da terapia principal/definitiva. Em algumas variações, o indivíduo foi anteriormente tratado. Em algumas variações, o indivíduo não foi anteriormente tratado. Em algumas variações, o tratamento é uma terapia de primeira linha.

Entenda-se que os aspectos e variações da invenção aqui descritos incluem "consistindo" e/ou "consistindo essencialmente em" aspectos e variações.

Como é entendido por um perito na especialidade, uma referência a "cerca de" um valor ou parâmetro aqui inclui (*e descreve*) concretizações que são dirigidas a esse valor ou parâmetro *per se*. Por exemplo, uma descrição que refere "cerca de X" inclui a descrição de "X".

### **Terapia de combinação com agente quimioterapêutico**

A presente invenção refere-se genericamente ao tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma

quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina); e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico. Em algumas variações, o taxano é qualquer de (e em algumas variações consistindo essencialmente em) paclitaxel, docetaxel e ortataxel. De acordo com a invenção, um agente quimioterapêutico obrigatório em combinação com a) é um anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreende Abraxane®. Como aqui divulgado, **um adicionalmente agente quimioterapêutico** pode ser qualquer de (e em algumas variações seleccionado do grupo que consiste em) agentes antimetabolito (incluindo análogos de nucleósidos), agentes à base de platina, agentes alquilantes, inibidores de tirosina-quinase, antibióticos de antraciclina, alcalóides de vinca, inibidores de proteassomas, macrólidos e inibidores de topoisomerase.

Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, a composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, a razão em peso entre a albumina e o paclitaxel na composição é cerca de 18:1 ou inferior, tal como cerca de 9:1 ou inferior. Em algumas variações, o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e a composição de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é Abraxane®,

As combinações de fármacos preferidas para administração sequencial ou co-administração ou administração simultânea com Abraxane® são aquelas que apresentam actividade antiproliferativa melhorada quando comparados com os componentes individuais isoladamente, especialmente

combinações que conduzem a regressão de tecidos proliferativos e/ou cura de doenças proliferativas.

Os agentes quimioterapêuticos aqui descritos podem ser os próprios agentes, seus sais farmaceuticamente aceitáveis, e seus ésteres farmaceuticamente aceitáveis, assim como estereoisómeros, enantiómeros, misturas racémicas, e similares. Podem ser administrados o agente ou agentes quimioterapêuticos como descrito, assim como uma composição farmacêutica contendo o(s) agente(s), em que a composição farmacêutica compreende um veículo transportador farmaceuticamente aceitável, ou similares.

O agente quimioterapêutico pode estar presente numa composição de nanopartículas. Por exemplo, em algumas variações, é proporcionado um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina); e b) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo pelo menos um outro agente quimioterapêutico e uma proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, o método compreende a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane<sup>®</sup>); e b) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo pelo menos um outro agente quimioterapêutico e uma proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é qualquer de (e em algumas variações seleccionado do grupo que consiste em) tiocolchicina ou seus derivados (tal como tiocolchicina dimérica, incluindo por exemplo nab-5404, nab-5800 e nab-5801), rapamicina ou seus derivados e geldanamicina ou seus derivados (tal como 17-alilaminogeldanamicina (17-AAG)). Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é rapamicina. Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é 17-AAG.

É aqui proporcionada uma listagem exemplificativa e não limitante de agentes quimioterapêuticos contemplados. Os

agentes quimioterapêuticos adequados incluem, por exemplo, alcalóides de vinca, agentes que quebram a formação de microtúbulos (tais como colchicinas e seus derivados), agentes antiangiogénicos, anticorpos terapêuticos, agentes de direccionamento para EGFR, agentes de direccionamento para tirosina-quinase (tais como inibidores de tirosina-quinase), complexos de metais de transição, inibidores de proteassomas, antimetabolitos (tais como análogos de nucleósidos), agentes alquilantes, agentes à base de platina, antibióticos de antraciclina, inibidores de topoísomerase, macrólidos, anticorpos terapêuticos, retinóides (tais como ácidos retinóicos todo-trans ou seus derivados); geldanamicina ou um seu derivado (tal como 17-AAG), e outros agentes quimioterapêuticos padrão bem reconhecidos na especialidade.

Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é qualquer de (e em algumas variações seleccionado do grupo que consiste em) adriamicina, colchicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina, metotrexato, mitoxantrona, fluorouracilo, carboplatina, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatina, etoposido, interferões, camptotecina e seus derivados, fenesterina, taxanos e seus derivados (e.g., paclitaxel e seus derivados, taxotere e seus derivados, e similares), topotecano, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, pipossulfano, nab-5404, nab-5800, nab-5801, Irinotecano, HKP, Ortataxel, gemcitabina, Herceptin®, vinorelbina, Doxil®, capecitabina, Alimta®, Avastin®, Velcade®, Tarceva®, Neulasta®, Lapatinib, Sorafenib, seus derivados, agentes quimioterapêuticos conhecidos na especialidade, e similares. Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um derivado de tiocolchicina e uma proteína transportadora (tal como albumina).

Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é um agente antineoplásico incluindo, mas não se lhes limitando, carboplatina, Navelbine® (vinorelbina), antraciclina (Doxil®), lapatinib (GW57016), Herceptin®, gemcitabina (Gemzar®), capecitabina (Xeloda®), Alimta®, cisplatina, 5-fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida, Avastin®, Veicade®, etc.

Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é um antagonista de outros factores que estão envolvidos no crescimento tumoral, tais como EGFR, ErbB2 (também conhecido como Herb), ErbB3, ErbB4 ou TNF. Por vezes, pode ser benéfico também administrar uma ou mais citóquinas ao indivíduo. Em algumas variações, o agente terapêutico é um agente inibidor do crescimento. As dosagens adequadas para o agente inibidor do crescimento são as presentemente utilizadas e podem ser diminuídas devido à acção combinada (sinergia) do agente inibidor do crescimento e do taxano.

Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é um agente quimioterapêutico outro que não um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo HER2, um interferão e um antagonista de HGF .

A referência a um agente quimioterapêutico aqui aplica-se ao agente quimioterapêutico ou seus derivados e desse modo a invenção contempla e inclui cada uma destas variações (agente; agente ou derivado(s)). "Derivados" ou "análogos" de um agente quimioterapêutico ou outra porção química incluem, mas não se lhes limitando, compostos que são estruturalmente similares ao agente quimioterapêutico ou à porção ou estão na mesma classe química geral que o agente quimioterapêutico ou porção. Em algumas variações, o derivado ou análogo do agente quimioterapêutico ou da porção retêm propriedades químicas e/ou físicas similares (incluindo, por exemplo, a funcionalidade) do agente quimioterapêutico ou porção.

O agente quimioterapêutico pode ser um inibidor de tirosina-quinase. Os inibidores de tirosina-quinase adequados incluem, por exemplo, imatinib (Gleevec®), gefitinib (Iressa®), Tarceva, Sutent® (maleato de sunitinib) e Lapatinib. Em algumas variações, o inibidor de tirosina-quinase é lapatinib. Em algumas variações, o inibidor de tirosina-quinase é Tarceva. O Tarceva é um inibidor de molécula pequena do receptor do factor de crescimento epidérmico humano do tipo 1/ receptor do factor de crescimento epidérmico (HER1/EGFR) que demonstrou, num ensaio clínico de Fase III, uma sobrevivência acrescida em indivíduos com cancro do pulmão de células não pequenas (CPCNP) avançado. Neste caso, pode ser tratado cancro da mama, incluindo cancro da mama metastático e cancro da mama num cenário de neo-

adjuvante. Em algumas variações, pode ser tratado um tumor sólido avançado. Em algumas variações, a proliferação de tumores que expressam EGFR pode ser inibida num mamífero por administração a um mamífero infectado com estes tumores de Abraxane® e gefitinib, em que o gefitinib é administrado em dosagem por pulsos.

O agente quimioterapêutico pode ser um agente antimetabolito (tal como um análogo de nucleósido, incluindo por exemplo análogos de purina e análogos de pirimidina). Um "agente antimetabolito" é um agente que é estruturalmente similar a um metabolito, mas não pode ser utilizado pelo corpo de uma maneira produtiva. Muitos agentes antimetabolito interferem com a produção de ácidos nucleicos, ARN e ADN. Por exemplo, o antimetabolito pode ser um análogo de nucleósido, que inclui, mas não se lhes limitando, azacitidina, azatioprina, capecitabina (Xeloda®), citarabina, cladribina, arabinósido de citosina (ara-C, Cytosar), doxifluridina, fluorouracilo (tal como 5-fluorouracilo), UFT, hidoxiureia, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina (tal como 6-tioguanina). Outros antimetabolitos incluem, por exemplo, L-asparaginase (Elspa), decarbazina (DTIC), 2-desoxi-D-glucose e procarbazina (Matulane). Em algumas variações, o análogo de nucleósido é qualquer de (e em algumas variações seleccionado do grupo que consiste em) gemcitabina, fluorouracilo e capecitabina. Em algumas variações, está contemplado cancro da mama metastático ou cancro da mama localmente avançado. Em algumas variações, pode ser tratado o cancro da mama metastático. Em algumas variações, pode ser tratado cancro da mama num cenário de neo-adjuvante. Em algumas variações, pode ser tratado qualquer de CPCNP, cancro colorrectal metastático, cancro pancreático ou tumor sólido avançado.

O agente quimioterapêutico pode ser um agente alquilante. Os agentes alquilantes adequados incluem, mas não se lhes limitando, ciclofosfamida (Cytoxan), mecloretamina, clorambucilo, melfalano, carmustina (BCNU), tiotepa, bussulfano, sulfonatos de alquilo, etilenoiminas, análogos de mostardas de azoto, estramustina-fosfato de sódio, ifosfamida, nitrosoureas, lomustina e estreptozocina. Em algumas variações, o agente alquilante é ciclofosfamida. Em algumas variações, a ciclofosfamida é administrada antes da

administração da composição de nanopartículas. Em algumas variações, está contemplado o tratamento de um estádio inicial de cancro da mama. Em algumas variações, pode ser tratado um cancro da mama num cenário de adjuvante ou neo-adjuvante.

O agente quimioterapêutico pode ser um agente à base de platina. Os agentes à base de platina adequados incluem, mas não se lhes limitando, carboplatina, cisplatina e oxaliplatina. Em algumas variações, o agente à base de platina é carboplatina. Neste caso, podem ser tratados cancro da mama (positivo para HER2 ou negativo para HER2, incluindo cancro da mama metastático e cancro da mama avançado); cancro do pulmão (incluindo CPCNP avançado, CPCNP em primeira linha, CPCP e malignidades de tumor sólido avançado no pulmão); cancro ovariano; cancro da cabeça e pescoço; e melanoma (incluindo melanoma metastático).

O agente quimioterapêutico pode ser um antibiótico de antraciclina. Os antibióticos de antraciclina adequados incluem, mas não se lhes limitando, Doxil®, actinomicina, dactinomicina, daunorrubicina (daunomicina), doxorrubicina (adriamicina), epirrubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina. Em algumas variações, a antraciclina é qualquer uma de (e em algumas variações seleccionada do grupo que consiste em) Doxil®, epirrubicina e doxorrubicina. Em algumas variações, pode ser tratado um cancro da mama em estádio inicial ou um cancro da mama num cenário de adjuvante ou de neo-adjuvante.

O agente quimioterapêutico pode ser um alcalóide de vinca. Os alcalóides de vinca adequados incluem, por exemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina (Navelbine®) e VP-16. Em algumas variações, o alcalóide de vinca é vinorelbina (Navelbine®). Em algumas variações, está contemplado o tratamento de cancro do pulmão e cancro da mama de estádio IV.

O agente quimioterapêutico pode ser um macrólido. Os macrólidos adequados incluem, por exemplo, rapamicina, carbomicina e eritromicina. Em algumas variações, o macrólido é rapamicina ou um seu derivado. Em algumas variações, é tratado um tumor sólido.

O agente quimioterapêutico pode ser um inibidor de topoisomerase. Um inibidor de topoisomerase é, por exemplo, inibidor de topoisomerase I e topoisomerase II. Os inibidores de topoisomerase I exemplificativos incluem, mas não se lhes limitando, camptotecina, tal como Irinotecano e topotecano. Os inibidores de topoisomerase II exemplificativos incluem, mas não se lhes limitando, amsacrina, etoposido, fosfato de etoposido e teniposido.

O agente quimioterapêutico pode ser um agente antiangiogénico. Podem ser tratados cancro da mama metastático, cancro da mama num cenário de adjuvante ou num cenário de neo-adjuvante, cancro do pulmão (tal como CPCNP avançado em primeira linha e CPCNP), cancro ovariano e melanoma (incluindo melanoma metastático).

Muitos agentes antiangiogénicos foram identificados e são conhecidos na especialidade, incluindo os listados por Carmeliet e Jain (2000). O agente antiangiogénico pode ser de ocorrência natural ou não ocorrer naturalmente. Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é um péptido antiangiogénico sintético. Por exemplo, foi anteriormente reportado que a actividade antiangiogénica de péptidos pró-apoptóticos pequenos sintéticos compreendem dois domínios funcionais, um direcionado para os receptores de CD13 (aminopeptidase N) em microvasos tumorais e o outro que rompe a membrana mitocondrial após internalização. *Nat. Med.* 1999, 5(9):1032-8. Verificou-se que um péptido dimérico de segunda geração, CNGC-GG-d(KLAKLAK)2, denominado HKP ("Hunter Killer Peptide") tem actividade antitumoral melhorada. Desse modo, em algumas variações, o péptido antiangiogénico é HKP. Em algumas variações, o agente antiangiogénico é outro que não um anticorpo anti-VEGF (tal como Avastin®).

O agente quimioterapêutico pode ser um inibidor de proteassomas, tal como bortezomib (Velcade).

O agente quimioterapêutico pode ser um anticorpo terapêutico. Os anticorpos terapêuticos adequados incluem, mas não se lhes limitando, anticorpo anti-VEGF (tal como Avastin® (bevacizumab)), anticorpo anti-HER2 (tal como Herceptin®

(trastuzumab)), Erbitux® (cetuximab), Campath (alemtuzumab), Mylotarg (gemtuzumab), Zevalin (ibritumomab tiuextano, Rituxan (rituximab) e Bexxar (tositumomab). Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é Erbitux® (cetuximab). Em algumas variações, o agente quimioterapêutico é um anticorpo terapêutico outro que não um anticorpo contra VEGF ou HER2. Em algumas variações, podem ser tratados cancro da mama positivo para HER2, incluindo tratamento de cancro da mama avançado, tratamento de cancro metastático, tratamento de cancro da mama num cenário de adjuvante e tratamento de cancro num cenário de neo-adjuvante, qualquer de cancro da mama metastático, cancro da mama num cenário de adjuvante ou num cenário de neo-adjuvante, cancro do pulmão (tal como CPCNP avançado em primeira linha e CPCNP), cancro ovariano, cancro da cabeça e pescoço e melanoma (incluindo melanoma metastático). Por exemplo, o cancro da mama positivo para HER2 metastático num indivíduo pode ser tratado por administração ao indivíduo de 125 mg/m<sup>2</sup> de composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina (tal como Abraxane®) semanalmente durante três semanas com a quarta semana de folga, concorrente com a administração de Herceptin®.

De acordo com a invenção utiliza-se: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano e uma proteína transportadora, em combinação com b) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e uma quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e até cerca de 10 mg/kg, para o tratamento de melanoma. Em algumas variações, as quantidades eficazes da composição de nanopartículas do taxano e do anticorpo anti-VEGF inibem sinergicamente a proliferação celular (tal como o crescimento de células tumorais). Em algumas variações, são inibidos pelo menos cerca de 10% (incluindo por exemplo pelo menos cerca de qualquer de 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%) da proliferação celular. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado por administração

intravenosa. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, tanto o taxano na composição de nanopartículas como o anticorpo anti-VEGF são administrados por administração intravenosa.

De acordo com outro aspecto da invenção é utilizada a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano e uma proteína transportadora, em combinação com b) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e até cerca de 10 mg/kg, para a inibição da metástase tumoral (tal como metástase de cancro da mama). Em algumas variações, as quantidades eficazes da composição de nanopartículas do taxano e do anticorpo anti-VEGF inibem sinergicamente a metástase tumoral. Em algumas variações, são inibidos pelo menos cerca de 10% (incluindo por exemplo pelo menos cerca de qualquer de 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%) da metástase. Em algumas variações, é proporcionado um método de inibição da metástase para os nódulos linfáticos. Em algumas variações, é proporcionado um método de inibição da metástase para o pulmão. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano na nanopartícula na composição é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, tanto o taxano na composição de nanopartículas como o anticorpo anti-VEGF são administrados por administração intravenosa.

As dosagens adequadas para o anticorpo anti-VEGF incluem, por exemplo, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg (tal como cerca de qualquer de 2, 4, 6, 8 ou 10 mg/kg). Em algumas variações, a dosagem do anticorpo anti-VEGF é cerca de 40 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup>, incluindo por exemplo cerca de 100 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 100, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>). Em algumas variações, o taxano é

paclitaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®).

As combinações adequadas das quantidades do taxano numa composição de nanopartículas e do anticorpo anti-VEGF incluem, por exemplo, cerca de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg (tal como cerca de qualquer de 2, 5, 10 ou 15 mg/kg) do taxano numa composição de nanopartículas e cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg (tal como cerca de qualquer de 2, 4, 6, 8 ou 10 mg/kg) do anticorpo anti-VEGF; cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 45, 60, 100, 150, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>) do taxano numa composição de nanopartículas e 40 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup>, incluindo por exemplo cerca de 100 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 100, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>) do anticorpo anti-VEGF; cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 300 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 45, 60, 100, 150, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>) do taxano numa composição de nanopartículas e cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg (tal como cerca de qualquer de 2, 4, 6, 8 ou 10 mg/kg) do anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, o método compreende a administração a um indivíduo de pelo menos cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> do taxano numa composição de nanopartículas e pelo menos cerca de qualquer de 2, 4, 8 ou 10 mg/kg de anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®).

Em algumas variações do método, a composição de nanopartículas do taxano e o anticorpo anti-VEGF são administrados simultaneamente ao indivíduo. Em algumas variações do método, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico são concorrentes. Um regime de dosagem exemplificativo para a terapia de combinação da composição de nanopartículas de taxano inclui a administração de 100 mg/m<sup>2</sup> - 300 mg/m<sup>2</sup> (tal como 200 mg/m<sup>2</sup>) de taxano na composição de nanopartículas pelo menos semanalmente (incluindo por exemplo a cada 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias) concorrente com a administração de 2 mg/kg - 10 mg/kg (tal como qualquer de 4, 6, 8 ou 10 mg/kg) do

anticorpo anti-VEGF a cada duas semanas ou mais frequentemente (por exemplo uma vez por semana, duas vezes por semana ou três vezes por semana). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®).

Em algumas variações, a composição de nanopartículas do taxano e o anticorpo anti-VEGF são administrados sequencialmente ao indivíduo. Por exemplo, em algumas variações, a composição de nanopartículas do taxano é administrada durante pelo menos um (tal como pelo menos qualquer um de dois, três, quatro, cinco ou seis) ciclos antes da administração do anticorpo anti-VEGF. Esta é então seguida pela administração de um anticorpo anti-VEGF pelo menos uma vez (tal como duas vezes) por semana durante pelo menos cerca de 3 (tal como 4, 5, ou 6) semanas. Um regime de dosagem exemplificativo para a terapia de combinação da composição de nanopartículas de taxano (tal com uma composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina, por exemplo Abraxane®) e do anticorpo anti-VEGF (tal como bevacizumab, por exemplo Avastin®) inclui a administração de 10 mg/kg de taxano numa composição de nanopartículas diariamente durante 5 dias em dois ciclos separados por uma semana, seguida por administração de um anticorpo anti-VEGF em dosagens de 2 mg/kg, 4 mg/kg ou 8 mg/kg duas vezes por semana durante 6 semanas. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®).

Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado semanalmente. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas.

Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a

quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de três em três semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas.

De acordo com a invenção, o melanoma é tratado por administração ao indivíduo de: (1) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora, e (2) um quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado semanalmente. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado de três em três semanas. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz do

anticorpo anti-VEGF é cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 8 mg/kg.

De acordo com a invenção, o taxano é preferivelmente paclitaxel. Em algumas concretizações, a proteína transportadora é albumina. Em algumas concretizações, o taxano é paclitaxel e a proteína transportadora é albumina. Em algumas concretizações, a albumina é albumina sérica humana. Em algumas concretizações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane. O anticorpo anti-VEGF é preferivelmente bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas concretizações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas concretizações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado semanalmente. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de três em três semanas. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz de bevacizumab é cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 8 mg/kg.

De acordo com a invenção, a metástase tumoral (tal como a metástase de cancro da mama) num indivíduo é inibida por

administração ao indivíduo de: (1) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora, e (2) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg ou superior a 15 mg/kg e inferior a 20 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado semanalmente. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano na composição de nanopartículas é administrado de três em três semanas. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 8 mg/kg.

Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, a albumina é albumina sérica humana. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*,

Avastin®). Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado semanalmente. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de três em três semanas. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz de bevacizumab é cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 8 mg/kg.

Em algumas variações, a metástase tumoral é cancro da mama metastático, cancro do pulmão metastático, cancro da próstata metastático, cancro ovariano metastático ou melanoma metastático. Em algumas variações, a metástase tumoral é cancro da mama metastático. Em algumas variações, o cancro da mama metastático é fortemente pré-tratado com antracilinas e/ou taxanos. Em algumas variações, o cancro do pulmão metastático é cancro do pulmão de células não pequenas (CPCNP) metastático.

De acordo com uma concretização da invenção, uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF é uma quantidade eficaz para suprimir a indução mediada por taxano de VEGF *in*

vivo quando é tratado o melanoma. Em algumas variações, a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo* é indução mediada por taxano de VEGF-A. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, a composição compreendendo um taxano é uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano são nanopartículas compreendendo paclitaxel. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano são nanopartículas compreendendo docetaxel. Em algumas variações, a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, a albumina é albumina sérica humana. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, as quantidades eficazes do taxano e do anticorpo anti-VEGF inibem sinergicamente a proliferação celular (tal como crescimento de células tumorais). Em algumas variações, são inibidos pelo menos cerca de 10% (incluindo por exemplo pelo menos cerca de qualquer de 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100%) da proliferação celular. Em algumas variações, o taxano é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, tanto o taxano como o anticorpo anti-VEGF são administrados por administração intravenosa.

Numa concretização, uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF é uma quantidade eficaz para suprimir a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo* quando é tratada a metástase. Em algumas variações, a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo* é indução mediada por taxano de VEGF-A. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, a composição compreendendo um taxano é uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora. Em algumas variações, as

nanopartículas compreendendo um taxano são nanopartículas compreendendo paclitaxel. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano são nanopartículas compreendendo docetaxel. Em algumas variações, a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, a albumina é albumina sérica humana. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, são inibidos pelo menos cerca de 10% (incluindo por exemplo pelo menos cerca de qualquer de 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%) metástase. Em algumas variações, é proporcionado um método de inibição da metástase para os nódulos linfáticos. Em algumas variações, é proporcionado um método de inibição da metástase para o pulmão. Em algumas variações, o taxano é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado por administração intravenosa. Em algumas variações, tanto o taxano como o anticorpo anti-VEGF são administrados por administração intravenosa.

As dosagens adequadas para o anticorpo anti-VEGF incluem, por exemplo, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, incluindo por exemplo cerca de 1 mg/kg a cerca de 15 mg/kg (tal como cerca de qualquer de 2, 4, 6, 8 ou 10 mg/kg). Em algumas variações, a dosagem do anticorpo anti-VEGF é cerca de 40 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup>, incluindo por exemplo cerca de 100 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 100, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®) e o taxano é paclitaxel.

As combinações adequadas das quantidades do taxano e do anticorpo anti-VEGF incluem, por exemplo, cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 45, 60, 100, 150, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>) do taxano e 40 mg/m<sup>2</sup> a cerca de

400 mg/m<sup>2</sup>, incluindo por exemplo cerca de 100 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 100, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>) do anticorpo anti-VEGF; cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 300 mg/m<sup>2</sup> (tal como cerca de qualquer de 45, 60, 100, 150, 200 ou 300 mg/m<sup>2</sup>) do taxano e cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg (tal como cerca de qualquer de 2, 4, 6, 8 ou 10 mg/kg) do anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, o método compreende a administração a um indivíduo de pelo menos cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> do taxano e pelo menos cerca de qualquer de 2, 4, 8 ou 10 mg/kg do anticorpo anti-VEGF. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®) e o taxano é paclitaxel.

Em algumas variações da invenção, o taxano e o anticorpo anti-VEGF são administrados simultaneamente ao indivíduo. Em algumas variações, a administração do taxano e do anticorpo anti-VEGF são concorrentes. Um regime de dosagem exemplificativo para a terapia de combinação do taxano (tal como paclitaxel) inclui a administração de 100 mg/m<sup>2</sup> - 300 mg/m<sup>2</sup> (tal como 200 mg/m<sup>2</sup>) do taxano pelo menos semanalmente (incluindo por exemplo a cada 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias) concorrente com a administração de 2 mg/kg - 10 mg/kg (tal como qualquer de 4, 6, 8 ou 10 mg/kg) do anticorpo anti-VEGF a cada duas semanas ou mais frequentemente (por exemplo uma vez por semana, duas vezes por semana ou três vezes por semana). Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®) e o taxano é paclitaxel.

Em algumas variações, o taxano e o anticorpo anti-VEGF são administrados sequencialmente ao indivíduo. Por exemplo, em algumas variações, o taxano é administrado durante pelo menos um (tal como pelo menos qualquer de dois, três, quatro, cinco ou seis) ciclos antes da administração do anticorpo anti-VEGF. Esta é depois seguida pela administração de um anticorpo anti-VEGF pelo menos uma vez (tal como duas vezes) por semana durante pelo menos cerca de 3 (tal como 4, 5 ou 6)

semanas. Um regime de dosagem exemplificativo para a terapia de combinação da composição de taxano (tal como uma composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina, por exemplo Abraxane®) e do anticorpo anti-VEGF (tal como bevacizumab, por exemplo Avastin®) inclui a administração de 10 mg/kg do taxano numa composição de nanopartículas diariamente durante 5 dias em dois ciclos separados de uma semana seguida por administração de um anticorpo anti-VEGF em dosagens de 2 mg/kg, 4 mg/kg ou 8 mg/kg duas vezes por semana durante 6 semanas. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®) e o taxano é paclitaxel.

De acordo com a invenção, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano é administrado semanalmente. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, o taxano é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz do taxano na composição é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano é administrado de três em três semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF está entre cerca de 5 e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é cerca de 2 mg/kg,

cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é administrado de duas em duas semanas ou de três em três semanas. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, o taxano é docetaxel. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®). Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (tal como Avastin®) e o taxano é paclitaxel.

Em algumas variações, o taxano é paclitaxel. Em algumas variações, a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, o taxano é paclitaxel e a proteína transportadora é albumina. Em algumas variações, a albumina é albumina sérica humana. Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane. Em algumas variações, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, as nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora são Abraxane e o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab (*i.e.*, Avastin®). Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 100 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado semanalmente. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 170 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de duas em duas semanas. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado de três em três semanas. Em algumas variações, o bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas. Em algumas variações de quaisquer dos métodos anteriores, a quantidade eficaz de bevacizumab é superior a

1 mg/kg e inferior a 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de bevacizumab é cerca de 2 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 8 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de bevacizumab é cerca de 10 mg/kg.

Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, a quantidade eficaz de Abraxane é cerca de 260 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o Abraxane é administrado semanalmente. Em algumas variações, a quantidade eficaz de bevacizumab está entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 10 mg/kg. Em algumas variações, bevacizumab é administrado a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas.

Em algumas concretizações, a metástase tumoral é cancro da mama metastático, cancro do pulmão metastático, cancro da próstata metastático, cancro ovariano metastático ou melanoma metastático. Em algumas variações, a metástase tumoral é cancro da mama metastático. Em algumas variações, o cancro da mama metastático é fortemente pré-tratado com antracilinas e/ou taxanos. Em algumas variações, o cancro do pulmão metastático é cancro do pulmão de células não pequenas (CPCNP) metastático.

A expressão "quantidade eficaz para suprimir a indução mediada por taxano de VEGF *in vivo*", como aqui se utiliza, refere-se a, e inclui, supressão, completa (incluindo substancialmente completa) e/ou parcial. Os métodos que indicam esta supressão são conhecidos na especialidade e estão aqui descritos, embora esteja entendido que aquando da administração a um paciente individual com base na prática médica estabelecida com base em ensaios clínicos, estas medições não precisam de ser dadas num indivíduo. Em algumas variações, a expressão "quantidade eficaz para suprimir a indução mediada por taxano de VEGF", como aqui se utiliza, refere-se a prevenção substancialmente completa da expressão e/ou actividade de VEGF ou redução na quantidade de expressão e/ou actividade de VEGF (tal como VEGF-A) em células, tecidos

ou fluidos *in vivo* após administração de uma formulação contendo um taxano. Em algumas variações, a redução na quantidade de expressão e/ou actividade de VEGF em células, tecidos ou fluidos *in vivo* após administração de uma formulação contendo um taxano é de pelo menos cerca de qualquer de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100%. Em algumas variações, a supressão da indução por taxano pode ser observada qualitativa e/ou quantitativamente por métodos conhecidos na especialidade e aqui descritos.

Em algumas variações, são administrados dois ou mais agentes quimioterapêuticos em adição ao taxano na composição de nanopartículas, sendo um dos agentes quimioterapêuticos um anticorpo anti-VEGF. Estes dois ou mais agentes quimioterapêuticos podem (mas não necessariamente) pertencer a diferentes classes de agentes quimioterapêuticos. São aqui proporcionados exemplos destas combinações. Outras combinações estão também contempladas.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), b) uma quantidade eficaz de um antimetabolito (tal como um análogo de nucleósido, por exemplo, gemcitabina), e c) um antibiótico de antraciclina (tal como epirrubicina). Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane<sup>®</sup>), b) uma quantidade eficaz de um antimetabolito (tal como um análogo de nucleósido, por exemplo, gemcitabina), e c) uma quantidade eficaz de um antibiótico de antraciclina (tal como epirrubicina). Em algumas variações, o método destina-se a tratamento do cancro da mama num cenário de neo-adjuvante. Por exemplo, em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro localmente avançado/inflamatório num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de 220 mg/m<sup>2</sup> de composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina (tal como Abraxane<sup>®</sup>) de

duas em duas semanas; 2000 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabina, de duas em duas semanas; e 50 mg/m<sup>2</sup> de epirrubicina, de duas em duas semanas. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro da mama num indivíduo num cenário de adjuvante, compreendendo a administração ao indivíduo de 175 mg/m<sup>2</sup> de composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina (tal como Abraxane<sup>®</sup>) de duas em duas semanas, 2000 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabina, de duas em duas semanas, e 50 mg/m<sup>2</sup> de epirrubicina, de duas em duas semanas.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), b) uma quantidade eficaz de um agente à base de platina (tal como carboplatina), e c) um anticorpo terapêutico (tal como anticorpo anti-HER2 (tal como Herceptin<sup>®</sup>) e anticorpo anti-VEGF (tal como Avastin<sup>®</sup>)). Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane<sup>®</sup>), b) uma quantidade eficaz de um agente à base de platina (tal como carboplatina), e c) um anticorpo terapêutico (tal como anticorpo anti-HER2 (tal como Herceptin<sup>®</sup>) e anticorpo anti-VEGF (tal como Avastin<sup>®</sup>)). Em algumas variações, o método destina-se a tratamento de qualquer de cancro da mama avançado, cancro da mama metastático, cancro da mama num cenário de adjuvante e cancro do pulmão (incluindo CPCNP e CPCNP avançado). Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro metastático num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de 75 mg/m<sup>2</sup> de composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina (tal como Abraxane<sup>®</sup>) e carboplatina, AUC=2, em que a administração é realizada semanalmente durante três semanas com a quarta semana de folga. Em algumas variações, o método adicionalmente compreende a administração semanal de cerca de 2-4 mg/kg de Herceptin<sup>®</sup>.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), b) uma quantidade eficaz de um agente à base de platina (tal como carboplatina), e c) um alcalóide de vinca (tal como Navelbine®). Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane®), b) uma quantidade eficaz de um agente à base de platina (tal como carboplatina), e c) um alcalóide de vinca (tal como Navelbine®). Em algumas variações, o método destina-se a tratamento de cancro do pulmão.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), b) uma quantidade eficaz de um agente alquilante (tal como ciclofosfamida) e c) um antibiótico de antraciclina (tal como adriamicina). Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina, b) uma quantidade eficaz de um agente alquilante (tal como ciclofosfamida) e c) um antibiótico de antraciclina (tal como adriamicina). Em algumas variações, o método destina-se a tratamento de um cancro da mama em estádio inicial. Em algumas variações, o método destina-se a tratamento de um cancro da mama num cenário de adjuvante ou de neo-adjuvante. Por exemplo, em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de um cancro da mama em estádio inicial num indivíduo, compreendendo a administração de 260 mg/m<sup>2</sup> de composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina (tal como Abraxane®), 60 mg/m<sup>2</sup> de adriamicina e 600 mg/m<sup>2</sup> de

ciclofosfamida, em que a administração é realizada uma vez de duas em duas semanas.

Outros métodos de referência são proporcionados na Tabela 1. Por exemplo, em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro da mama avançado num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane®), b) uma quantidade eficaz de carboplatina. Em algumas variações, o método adicionalmente compreende a administração de uma quantidade eficaz de Herceptin® ao indivíduo. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro da mama metastático num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane®), b) uma quantidade eficaz de gemcitabina. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro do pulmão de células não pequenas avançado num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane®), b) uma quantidade eficaz de carboplatina.

É aqui adicionalmente descrita para referência uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel, docetaxel ou ortataxel) e uma proteína transportadora (tal como albumina) e pelo menos um outro agente quimioterapêutico. As composições aqui descritas podem compreender quantidades eficazes do taxano e do agente quimioterapêutico para o tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro). Em algumas variações, o agente quimioterapêutico e o taxano estão presentes na composição numa razão predeterminada, tal como as razões de pesos aqui descritas. Em algumas variações, é aqui descrita uma composição sinérgica de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel, docetaxel ou ortataxel) e uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico. Em algumas variações, o outro agente

quimioterapêutico é um anticorpo anti-VEGF (tal como bevacizumab, por exemplo, Avastin®).

Em algumas variações, são aqui descritas para referência composições farmacêuticas compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina) para utilização no tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro), em que a referida utilização compreende a administração simultânea e/ou sequencial de pelo menos um outro agente quimioterapêutico. Em algumas variações, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um agente quimioterapêutico para utilização no tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro), em que a referida utilização compreende a administração simultânea e/ou sequencial de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, são aqui descritas composições de nanopartículas contendo taxano e composições compreendendo um outro agente quimioterapêutico para utilização simultânea e/ou sequencial para tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro).

### **Modos de Administração**

A composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano (também referida como "composição de nanopartículas") e o agente quimioterapêutico podem ser administrados simultaneamente (*i.e.*, administração simultânea) e/ou sequencialmente (*i.e.*, administração sequencial).

Em algumas variações, a composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico (incluindo os agentes quimioterapêuticos específicos aqui descritos) são administrados simultaneamente. A expressão "administração simultânea", como aqui se utiliza, significa que a composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico são administrados com um tempo de separação não superior a cerca de 15 minuto(s), tal como não superior a cerca de qualquer de 10, 5 ou 1 minutos. Quando os fármacos são administrados simultaneamente, o fármaco nas nanopartículas e o agente quimioterapêutico podem estar contidos na mesma composição (*e.g.*, uma composição compreendendo as nanopartículas e o

agente quimioterapêutico) ou em composições separadas (*e.g.*, as nanopartículas estão contidas numa composição e o agente quimioterapêutico está contido em outra composição). Por exemplo, o taxano e o agente quimioterapêutico podem estar presentes numa única composição contendo pelo menos duas nanopartículas diferentes, em que algumas das nanopartículas na composição compreendem o taxano e uma proteína transportadora, e algumas das outras nanopartículas na composição compreendem o agente quimioterapêutico e uma proteína transportadora. A invenção contempla e abrange estas composições. Em algumas variações, apenas o taxano está contido em nanopartículas. Em algumas variações, a administração simultânea do fármaco na composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser combinadas com doses suplementares do taxano e/ou do agente quimioterapêutico.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico são administrados sequencialmente. A expressão "administração sequencial", como aqui se utiliza, significa que o fármaco na composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico são administrados com um tempo de separação não superior a cerca de 15 minutos, tal como não superior a cerca de qualquer de 20, 30, 40, 50, 60 ou mais minutos. Quer a composição de nanopartículas quer o agente quimioterapêutico podem ser administrados primeiro. A composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico estão contidos em composições separadas, que podem estar contidas na mesma embalagem ou em embalagens diferentes.

Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico são concorrentes, *i.e.*, o período de administração da composição de nanopartículas e o do agente quimioterapêutico sobrepõem-se um ao outro. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico não são concorrentes. Por exemplo, em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas é terminada antes de o agente quimioterapêutico ser administrado. Em algumas variações, a administração do agente quimioterapêutico é terminada antes de a composição de nanopartículas ser administrada. O período de tempo entre estas duas

administrações não concorrentes pode variar de cerca de duas a oito semanas, tal como cerca de quatro semanas.

A frequência de dosagem da composição de nanopartículas contendo fármaco e do agente quimioterapêutico podem ser ajustadas ao longo do decorrer do tratamento, com base na opinião do médico que faz a administração. Quando administrados separadamente, a composição de nanopartículas contendo fármaco e o agente quimioterapêutico podem ser administrados com frequências ou intervalos de dosagem diferentes. Por exemplo, a composição de nanopartículas contendo fármaco pode ser administrada semanalmente, enquanto um agente quimioterapêutico pode ser administrado mais ou menos frequentemente. Em algumas variações pode ser utilizada uma formulação de liberação contínua sustentada das nanopartícula contendo fármaco e/ou do agente quimioterapêutico. São conhecidos na especialidade várias formulações e dispositivos para conseguir a liberação sustentada.

A composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico podem ser administrados utilizando a mesma via de administração ou diferentes vias de administração. Em algumas variações (para administração tanto simultânea como sequencial), o taxano na composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico são administrados numa razão predeterminada. Por exemplo, em algumas variações, a razão em peso entre o taxano na composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico é cerca de 1 para 1. Em algumas variações, a razão em peso pode estar entre cerca de 0,001 e cerca de 1 e cerca de 1000 e cerca de 1, ou entre cerca de 0,01 e cerca de 1 e 100 e cerca de 1. Em algumas variações, a razão em peso entre o taxano na composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico é inferior a cerca de qualquer de 100:1, 50:1, 30:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 e 1:1. Em algumas variações, a razão em peso entre o taxano na composição de nanopartículas e o agente quimioterapêutico é superior a cerca de qualquer de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 30:1, 50:1, 100:1. Estão contempladas outras razões.

As doses necessárias para o taxano e/ou para o agente quimioterapêutico podem ser (mas não necessariamente) inferiores às que são normalmente necessárias quando cada agente é administrado isoladamente. Assim, em algumas variações, são administradas quantidades subterapêuticas do fármaco na composição de nanopartículas e/ou do agente quimioterapêutico. Uma "quantidade subterapêutica" ou um "nível subterapêutico" referem-se a uma quantidade que é inferior à quantidade terapêutica, ou seja, inferior à quantidade normalmente utilizada quando o fármaco na composição de nanopartículas e/ou o agente quimioterapêutico são administrados isoladamente. A redução pode ser reflectida em termos da quantidade administrada numa determinada administração e/ou na quantidade administrada ao longo de um determinado período de tempo (frequência reduzida).

Em algumas variações, é administrado agente quimioterapêutico suficiente para permitir a redução da dose normal do fármaco na composição de nanopartículas necessária para efectuar o mesmo grau de tratamento em pelo menos cerca de qualquer de 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou mais. Em algumas variações, é administrado fármaco na composição de nanopartículas suficiente para permitir a redução da dose normal do agente quimioterapêutico necessária para efectuar o mesmo grau de tratamento em pelo menos cerca de qualquer de 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou mais.

Em algumas variações, tanto a dose do taxano na composição de nanopartículas como a do agente quimioterapêutico são reduzidas em comparação com as correspondentes doses normais de cada um quando administrados isoladamente. Em algumas variações, tanto o taxano na composição de nanopartículas como o agente quimioterapêutico são administrados a um nível subterapêutico, *i.e.*, reduzido. Em algumas variações, a dose da composição de nanopartículas e/ou a do agente quimioterapêutico são substancialmente inferiores à dose máxima tóxica (DMT) estabelecida. Por exemplo, a dose da composição de nanopartículas e/ou a do agente quimioterapêutico são inferiores a cerca de 50%, 40%, 30%, 20% ou 10% da DMT.

Pode ser utilizada uma combinação das configurações de administração aqui descritas. Os métodos de terapia de combinação aqui descritos podem ser realizados isoladamente ou em conjunto com outra terapia, tal como cirurgia, radiação, quimioterapia, imunoterapia, terapia génica, e similares. Adicionalmente, uma pessoa com um maior risco de desenvolver a doença proliferativa pode receber tratamentos para inibir e/ou retardar o desenvolvimento da doença.

Como será entendido pelas pessoas competentes na matéria, as doses apropriadas de agentes quimioterapêuticos serão aproximadamente as que são já empregues em terapias clínicas em que os agentes quimioterapêuticos são administrados isoladamente ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos. Ocorrerá provavelmente variação na dosagem dependendo da condição a tratar. Como descrito acima, em algumas variações, os agentes quimioterapêuticos podem ser administrados a um nível reduzido.

As composições de nanopartículas aqui descritas podem ser administradas a um indivíduo (tal como um ser humano) através de várias vias, tais como as vias parentérica, incluindo intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intrapulmonar, oral, por inalação, intravesicular, intramuscular, intratraqueal, subcutânea, intra-ocular, intratecal ou transdérmica. Por exemplo, a composição de nanopartículas pode ser administrada por inalação para tratar condições do tracto respiratório. A composição pode ser utilizada para tratar condições respiratórias tais como fibrose pulmonar, bronqueolite obliterante, cancro do pulmão, carcinoma bronqueoalveolar, e similares. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada intravenosamente. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada oralmente.

A frequência de dosagem da administração da composição de nanopartículas depende da natureza da terapia de combinação e da doença particular a tratar. Um exemplo de frequência de dosagem inclui, mas não se lhe limitando, semanalmente sem folgas; semanalmente, em três de quatro semanas; uma vez de três em três semanas; uma vez de duas em duas semanas;

semanalmente, em duas de três semanas. Veja-se também a Tabela 1.

A dose do taxano na composição de nanopartículas variará com a natureza da terapia de combinação e a doença particular a tratar. A dose deverá ser suficiente para efectuar uma resposta desejável, tal como uma resposta terapêutica ou profiláctica contra uma doença particular. Um exemplo de dose do taxano (em algumas variações paclitaxel) na composição de nanopartículas inclui, mas não se lhe limitando, cerca de qualquer de 50 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup>, 75 mg/m<sup>2</sup>, 80 mg/m<sup>2</sup>, 90 mg/m<sup>2</sup>, 100 mg/m<sup>2</sup>, 120 mg/m<sup>2</sup>, 160 mg/m<sup>2</sup>, 175 mg/m<sup>2</sup>, 200 mg/m<sup>2</sup>, 210 mg/m<sup>2</sup>, 220 mg/m<sup>2</sup>, 260 mg/m<sup>2</sup> e 300 mg/m<sup>2</sup>. Por exemplo, a dosagem de paclitaxel numa composição de nanopartículas pode estar na gama de 100-400 mg/m<sup>2</sup> quando dada num programa de 3 semanas, ou 50-250 mg/m<sup>2</sup> quando dada num programa semanal. Veja-se também a Tabela 1.

Outros esquemas de dosagem exemplificativos para a administração da composição de nanopartículas (tal como uma composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina, por exemplo Abraxane®) incluem, mas não se lhes limitando, 100 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, sem folgas; 75 mg/m<sup>2</sup> semanalmente, em 3 de quatro semanas; 100 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, em 3 de 4 semanas; 125 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, e 3 de 4 semanas; 125 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, em 2 de 3 semanas; 130 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, sem folgas; 175 mg/m<sup>2</sup>, uma vez a cada 2 semanas; 260 mg/m<sup>2</sup>, uma vez a cada 2 semanas; 260 mg/m<sup>2</sup>, uma vez a cada 3 semanas; 180-300 mg/m<sup>2</sup>, de três em três semanas; 60-175 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, sem folgas. Em adição, o taxano (isoladamente ou em terapia de combinação) pode ser administrado seguindo um regime de dosagem metronómica aqui descrito.

Os regimes de dosagem exemplificativos para a terapia de combinação da composição de nanopartículas (tal como uma composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina, por exemplo Abraxane®) e outros agentes incluem, mas não se lhes limitando, 125 mg/m<sup>2</sup> semanalmente, em duas de três semanas, mais 825 mg/m<sup>2</sup> de Xeloda®, diariamente; 260 mg/m<sup>2</sup> uma vez de duas em duas semanas, mais 60 mg/m<sup>2</sup> de adriamicina e 600 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, uma vez de duas em duas semanas; 220-

340 mg/m<sup>2</sup> uma vez de três em três semanas, mais carboplatina, AUC=6, uma vez de três em três semanas; 100-150 mg/m<sup>2</sup> semanalmente, mais carboplatina, AUC=6, uma vez de três em três semanas; 175 mg/m<sup>2</sup> uma vez de duas em duas semanas, mais 2000 mg/m<sup>2</sup> de gemcitabina e 50 mg/m<sup>2</sup> de epirrubicina, uma vez de duas em duas semanas; e 75 mg/m<sup>2</sup> semanalmente, em três de quatro semanas, mais carboplatina, AUC=2, semanalmente, em três de quatro semanas.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas do taxano e o agente quimioterapêutico são administrados de acordo com qualquer dos regimes de dosagem descritos na Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro da mama num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 1 a 35 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 1 a 35 da Tabela 1. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro da mama metastático num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 2, 4-8, e 10-15 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 2, 4-8 e 10-15 da Tabela 1.

Em algumas variações, é aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro da mama avançado num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um

outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 1 e 16 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 1 e 16 da Tabela 1. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro da mama de estádio IV num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado na Linha 3 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer regimes de dosagem indicados na Linha 3 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro da mama num indivíduo num cenário de adjuvante compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 18 a 24 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 18 a 24 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro da mama num indivíduo num cenário de neo-adjuvante compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 25 a 35 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 25 a 35 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro do pulmão num indivíduo compreendendo a

administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 36 a 48 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 36 a 48 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de CPCNP (incluindo CPCNP avançado e CPCNP em primeira linha) num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 36-40 e 42-43 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 36-40 e 42-43 da Tabela 1. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de uma malignidade de tumor sólido avançado no pulmão num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado na Linha 41 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser no regime de dosagem indicado na Linha 41 da Tabela 1. Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de CPCP num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado na Linha 48 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico pode ser no regime de dosagem indicado na Linha 48 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro ovariano num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 49 a 52 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 49 a 52 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro da cabeça e pescoço num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 53 a 55 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 53 a 55 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de um tumor sólido (incluindo tumor sólido avançado) num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 56 a 59 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 56 a 59 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de melanoma (incluindo melanoma metastático) num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas

Linhos 60-63 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 60 a 63 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro colorrectal metastático num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado na Linha 64 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser no regime de dosagem indicado na Linha 64 da Tabela 1.

É aqui descrito para referência um método de tratamento de cancro pancreático num indivíduo compreendendo a administração ao indivíduo de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina, e b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico conforme proporcionado nas Linhas 65 a 66 da Tabela 1. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 65 a 66 da Tabela 1.

TABELA 1

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
1.	ABX + Carboplatina + Herceptin®	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> D1, 8, 15 q4wk x6 Carbo: AUC = 2 D1, 8, 15 q4wk x6 Herceptin®: 4 mg/kg na sem 1, 2 mg/kg em todas as semanas subsequentes	Cancro da mama HER2+ avançado	Um estudo de fase II de paclitaxel em nanopartículas (ABI-007) semanal, dose densa; carboplatin™, com Herceptin® como terapia de primeira ou segunda linha de cancro da mama HER2+ avançado

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
2.	ABX sozinho (+Herceptin®)	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4	Cancro da mama metastático	Ensaio de fase II de monoterapia com Abraxane® semanal para CMM em primeira linha (mais Herceptin® em pacientes HER2+)
3.	ABX + Navelbine® ( $\pm$ G-CSF)	L1: ABX: 80 mg/m <sup>2</sup> Nav: 15 mg/m <sup>2</sup>  L2: ABX: 90 mg/m <sup>2</sup> Nav: 20 mg/m <sup>2</sup>  L3: ABX:100 mg/m <sup>2</sup> Nav: 22,5 mg/m <sup>2</sup>  L4: ABX:110 mg/m <sup>2</sup> Nav: 25 mg/m <sup>2</sup>  L5: ABX:125 mg/m <sup>2</sup> Nav: 25 mg/m <sup>2</sup> qwk todos os níveis	Cancro da mama de estágio IV	Estudo de fase I-II de ABX semanal + Navelbine®, com ou sem G-CSF, em cancro da mama de estádio IV
4.	ABX + Xeloda®	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> qwk x 2/3  Xeloda®: 825 mg/m <sup>2</sup> D1-14 q3wk	Cancro da mama metastático	Ensaio de fase II, 1.ª linha, de ABX + Xeloda® para CMM
5.	ABX + Antraciclina		Cancro da mama metastático	Ensaio de fase I/II de ABX mais Doxil® para CMM mais limitado pela PK
6.	ABX + Gemcitabina	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> Gem: 1000 mg/m <sup>2</sup> qwk x 2/3	Cancro da mama metastático	Ensaio de fase II Randomizado de nab (ligado a albumina em nanopartículas)- Paclitaxel (nab-paclitaxel) Semanal em Combinação com Gemcitabina em Pacientes com Cancro da mama metastático Negativo para HER2
7.	ABC+ Lapatinib		Cancro da mama metastático	Fase I/II, Abraxane® + GW572016

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
8.	ABX + Lapatinib	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwkx3/4 Lapatinib: partindo de 1000 mg/d x 2 dias	Cancro da mama metastático	Estudo de fase I de escalação da dose de quimiosensibilização de 2 dias com lapatinib oral em pulsos dados antes de Abraxane® intravenoso semanal em pacientes com tumores sólidos avançados
9.	ABX +FEC (+Herceptin®)	ABX: 220 mg/m <sup>2</sup> q2wk x 6 seguido por FEC: 4 ciclos (+Herceptin® para pacientes HER2+)	Cancro da mama	Ensaio de fase II pré-operatório de Abraxane® seguido por FEC (+Herceptin® conforme apropriado) em cancro da mama
10.	ABX + Carboplatina + Avastin®	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk D1, 8, 15 Carbo: AUC = 2 qwk D1, 8, 15 Avastin®: 10 mg/m <sup>2</sup> q2wk	Cancro da mama metastático (HER2-, ER-, PR-)	Estudo de fase II de segurança e tolerabilidade de Abraxane®, Avastin® e carboplatina em pacientes de cancro da mama metastático triplamente negativos
11.	ABX + Avastin®	ABX: 130 mg/m <sup>2</sup> qwk + Avastin® vs ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q2wk + Avastin® vs ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk + Avastin®	Cancro da mama metastático	Ensaio de fase II de três braços em pacientes de CMM negativo para HER2 em 1.ª linha
12.	ABX + Avastin®	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4 + Avastin®	Cancro da mama metastático	Estudo de um braço de Abraxane® e Avastin® em CMM em 1.ª linha
13.	ABX + Avastin®	ABX + Avastin® qwk vs Taxol® + Avastin® qwk	Cancro da mama metastático	Ensaio de fase III randomizado em CMM em 1.ª linha e 2.ª linha com análise de correlativos biológicos

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
14.	ABX + Xeloda® + Lapatinib		Cancro da mama metastático	Fase II de Abraxane® em combinação com Xeloda® e Lapatinib para cancro da mama metastático
15.	ABX+ Gemcitabina	ABX: 3000 mg/m <sup>2</sup> D1 q3wk Gem: 1250 mg/m <sup>2</sup> D1, 8 q3wk	Cancro da mama metastático	Estudo de fase II de um braço de Abraxane® e gemcitabina para CMM em 1.ª linha
16.	ABX + RAD001		Cancro da mama avançado	Estudo de fase I/II de Abraxane® em combinação com RAD001 em pacientes com cancro da mama avançado
17.	ABX + Sutent®		Cancro da mama	Estudo de fase I de Abraxane® em combinação com Sutent®
18.	ABX + AC + G-CSF (+ Herceptin®)	AC + G-CSF q2wk x 4 seguidos por ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q2wk x 4 (+ Herceptin® para pacientes HER2+)	Cancro da mama- Adjuvante	Abraxane® em quimioterapia adjuvante de dose densa para cancro da mama em estádio inicial
19.	ABX+AC+G-CSF (+ Herceptin®)	Dose densa AC + G-CSF seguido por ABX (+ Herceptin® para pacientes HER2+) qwk	Cancro da mama- Adjuvante	Ensaio adjuvante piloto de fase II de Abraxane® em cancro da mama
20.	ABX + AC	AC seguido por ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> vs AC seguido por Taxol® Rx extensão de 16 sem	Cancro da mama- Adjuvante	Ensaio para registo, Adjuvante, Dose densa
21.	ABX + AC (+G-CSF)	AC q2wk seguido por ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> + G-CSF q2wk Rx extensão de 16 sem	Cancro da mama- Adjuvante	Estudo adjuvante piloto de fase II de dose densa de Abraxane® em cancro da mama

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
22.	ABX + AC (+ Avastin®)	Dose densa AC seguido por ABX (+ Avastin® em pacientes HER2+)	Cancro da mama- Adjuvante	Estudo adjuvante piloto de cancro da mama
23.	ABX + AC	AC seguido por ABX q2wk ou q3wk	Cancro da mama- Adjuvante	estudo BIG: Dose densa vs quimioterapia adjuvante padrão
24.	ABX (ABI-007) +AC+ Neulasta®	AC seguido por ABX q2wk x 4	Cancro da mama – Adjuvante	Estudo Piloto de Fase II - Avaliação da segurança de um Regime de Dose Densa - AC x 4 => ABI-007 x 4 Q 2 SEMANAS + Neulasta® - Dado como Quimioterapia Adjuvante de Mulheres de Alto Risco com Cancro da mama inicial
25.	ABX +FEC (+Herceptin®)	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk x 12 seguido por 5-FU: 500 mg/m <sup>2</sup> q3wk Epirubicina: 100 mg/m <sup>2</sup> (sem Herceptin®) ou Epirubicina: 75 mg/m <sup>2</sup> (com Herceptin® para pacientes HER2+) Ciclofosfamida: 500 mg/m <sup>2</sup> q3wk	Cancro da mama localmente avançado – Neo-adjuvante	Um Estudo de Fase II de Quimioterapia Neo-adjuvante com Paclitaxel ligado a Albumina em Nanopartículas (Abraxane®) Sequencial Semanal Seguido por 5-Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida (FEC) em Cancro da mama localmente avançado
26.	ABX + Gemcitabina + Epirubicina	Braço 1: Neo- adjuvante: Gem: 2000 mg/m <sup>2</sup> , ABX: 175 mg/m <sup>2</sup> , Epi 50 mg/m <sup>2</sup> q2wk x 6 Braço 2: Adjuvante: Gem: 2000 mg/m <sup>2</sup> , ABX: 220 mg/m <sup>2</sup> q2wk x 4	Cancro da mama - Neo- adjuvante	Ensaio de Fase II de Dose Densa, Neo- adjuvante, Gemcitabina, Epirubicina, ABI-007 (GEA) em Cancro da mama localmente avançado ou inflamatório

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
27.	ABX + Herceptin®	ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q2wk + Herceptin® seguido por Navelbine® + Herceptin®	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Estudo de fase II multicentrado neo-adjuvante.
28.	ABX + Carboplatina (+ Herceptin®) +AC	TAC vs AC seguido por ABX + carbo vs AC seguido por ABX + carbo + Herceptin®	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio de fase II de dose densa randomizado de 3 braços de quimioterapia neo-adjuvante em pacientes com cancro da mama
29.	ABX + Capecitabina	ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk x 4 Xeloda® 850 mg/m <sup>2</sup> D1-14 q3wk x 4	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio de fase II de neo-adjuvante de Abraxane® e capecitabina em cancro da mama localmente avançado
30.	ABX + Carboplatina (+ Avastin®)	ABX qwk carbo qwk +Avastin® em pacientes HER2+	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio de fase I/II de quimioterapia neo-adjuvante (NCT) com nanopartículas de paclitaxel (ABI-007, Abraxane®) semanais em combinação com carboplatina e Avastin® em estádio clínico I-III.
31.	ABX + Carboplatina + Herceptin® + Avastin®	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwkx3/4 Carbo: AUC = 5 + Herceptin® + Avastin® ciclo de 4 semanas x 6	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Estudo de fase II de bevacizumab semanal administrado com trastuzumab semanal, ABI-007, e carboplatina como terapia pré-operatória em tumores de cancro da mama HER2- com gene neu amplificado

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
32.	ABX + Lapatinib	ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk Lapatinib: 1000 mg/dia	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio piloto de neo-adjuvante com combinação de ABI-007 (Abraxane®) e GW572016 (Lapatinib)
33.	ABX + Capecitabina	ABX: 200 mg/m <sup>2</sup> q3wk x 4 Xeloda®: 1000 mg/m <sup>2</sup> D1-14 q3wk x 4	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio de fase II de neo-adjuvante de Abraxane® e capecitabina em cancro da mama localmente avançado
34.	ABX ± Avastin® + AC (+ G-CSF)	ABX qwk ± Avastin® seguido por A qwk + C diário vs Taxol® qwk ± Avastin® seguido por A qwk + C diário	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio de fase III de paclitaxel vs Abraxane® com ou sem Avastin® em combinação com doxorrubicina e ciclofosfamida mais G-CSF
35.	ABX + AC	ABX seguido por AC	Cancro da mama - Neo-adjuvante	Ensaio de fase II de neo-adjuvante com análises de expressão génica
36.	ABX + Carboplatina + Avastin®	ABX: 300 mg/m <sup>2</sup> q3wk Carbo: AUC = 6 q3wk Avastin®: 15 mg/kg 4 ciclos	CPCNP Avançado em 1.ª linha	Um ensaio de fase II sem ocultação de Abraxane®, carboplatina e Avastin® em pacientes com cancro do pulmão de células não pequenas não escamosas avançado
37.	ABX + Carboplatina	L1: ABX:225 mg/m <sup>2</sup> L2: ABX:260 mg/m <sup>2</sup> L3: ABX:300 mg/m <sup>2</sup> Coortes 1-4: ABX q3wk Coortes 5-7: ABX semanal Coorte 8: 75 pacientes adicionais Carbo fixada a AUC = 6 q3wk	CPCNP Avançado	Estudo piloto de fase II de toxicidade de Abraxane® e carboplatina em cancro do pulmão de células não pequenas avançado.

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
38.	ABX + Carboplatina	Carbo: AUC = 6 + ABX vs Carbo: AUC = 6 + Taxol®: 225 mg/m <sup>2</sup>	CPCNP em 1.ª linha	Ensaio para registo de fase III - CPCNP terapia de 1.ª linha
39.	ABX + Carboplatina	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> d1, 8, 15 Carbo: AUC = 6 q4wk Emenda: ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> D1, 8, 15	CPCNP em 1.ª linha	Ensaio de fase II de Abraxane® semanal mais carboplatina em CPCNP em 1.ª linha
40.	ABX + Carboplatina + Avastin®	Semanalmente	CPCNP	
41.	ABX + Carboplatina	Braço 1: ABX: 100, 125, 150 mg/m <sup>2</sup> D1, 8, 15 q4wk Braço 2: ABX 220, 260, 300, 340 mg/m <sup>2</sup> q3wk Braço 3: ABX 100, 125, 150 mg/m <sup>2</sup> D1, 8 Carbo: AUC = 6 em todos os braços	Cancro do pulmão - Malignidade de tumor sólido avançado	Ensaio de fase I de carboplatina e Abraxane® num programa semanal e de três em três semanas em pacientes com Malignidades de tumor sólido avançado
42.	ABX + Gemcitabina ou ABX + Avastin®		CPCNP	Abraxane® em combinação com gemcitabina ou Avastin®
43.	ABX + Gemcitabina		CPCNP	Ensaio de fase I de Abraxane® em combinação com gemcitabina
44.	ABX + Carboplatina + Avastin®	ABX: 225, 260, 300 mg/m <sup>2</sup> Carbo: AUC = 6 q3wk + Avastin®	Cancro do pulmão	estudo de fase I/II de Abraxane® e carboplatina AUC 6, mais Avastin® (desenho padrão de fase I 3+3; FII: 40 pacientes)

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
45.	ABX + Alimta®	ABX: 220, 260, 300 mg/m <sup>2</sup> q3wk Pemetrexed: 500 mg q3wk	Cancro do pulmão	Estudo de fase I/II de Abraxane® + Alimta® para CPCNP em 2.ª linha
46.	ABX + Cisplatina		Cancro do pulmão	Ensaio de fase I/II de Abraxane® mais cisplatina em CPCNP avançado
47.	ABX + Navelbine® + Cisplatina		Cancro do pulmão	Estudo de fase I/II de Abraxane®, Navelbine®, e Cisplatina para tratamento de CPCNP avançado
48.	ABX + Carboplatina	ABX: 300 mg/m <sup>2</sup> q3wk Carbo: AUC = 6 q3wk = 6 q3wk	CPCP	Ensaio de fase II de Abraxane® e carboplatina em cancro do pulmão de células pequenas em estádio extensivo
49.	ABX + Carboplatina	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4 Carbo: AUC = 6	Cancro ovariano	Um ensaio de fase II de Abraxane® + Carboplatina em cancro ovariano recorrente
50.	ABX + Carboplatina	ABX: qwk ABX: q3wk Carbo: AUC = 6 em ambos os braços	Cancro ovariano	Estudo de fase I de Abraxane® mais carbo para tratamento de cancro ovariano avançado
51.	ABX + Carboplatina	ABX: TBD por ABI-CA034 vs Taxol® 175 mg/m <sup>2</sup> Carbo: AUC = 6 em ambos os braços	Cancro ovariano	Ensaio para registo, 1.ª linha, optimamente desavolumado. Carbo AUC 6 + ABX vs Carbo + Taxol® 175 mg/m <sup>2</sup> . Ponto final: sobrevivência sem recidiva, sobrevivência

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
52.	ABX + Avastin®	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4 Avastin®: 10 mg/m <sup>2</sup> q2wk	Cancro ovariano	Estudo de fase II de bevacizumab com Abraxane® em pacientes com carcinoma ovariano epitelial primário ou peritoneal primário, resistente a platina, recorrente
53.	ABX + 5-FU + Cisplatina	ABX:D1 5-FU: 750 mg/m <sup>2</sup> C IV x 5 cisplatina: 75 mg/m <sup>2</sup> D1 seguido por XRT/cirurgia	Cancro da cabeça e pescoço	Fase II, cancro da cabeça e pescoço localizado não ressecçãoável, Abraxane® em combinação com 5-FU e cisplatina
54.	ABX + 5-FU + Cisplatina	5-FU: 750 mg/m <sup>2</sup> CIV x 5 cisplatina: 75 mg/m <sup>2</sup> D1 ± ABX D1 seguido por XRT/cirurgia	Cancro da cabeça e pescoço	Fase III, cancro da cabeça e pescoço localizado não ressecçãoável, 5-FU e cisplatina com ou sem Abraxane®
55.	ABX + Cetuximab		Cancro da cabeça e pescoço	Ensaio de fase II multicentrado de Abraxane® em combinação com cetuximab em tratamento de 1.ª linha de cancro da cabeça e pescoço localmente avançado ou metastático
56.	ABX + Rapamicina	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk Rapamicina: 5-40 mg escalação da dose	Tumores sólidos	Estudo de fase I de Rapamicina em Combinação com Abraxane® em Tumores sólidos avançados
57.	ABX + Satraplatina		Tumores sólidos	Ensaio de fase I de Abraxane® e Satraplatina

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
58.	ABX + Gemcitabina	ABX: 180, 220, 260, 300, 340 mg/m <sup>2</sup> q3wk Gemcitabina: 1000 mg/m <sup>2</sup> D1 e D8	Tumores sólidos avançados	Ensaio de fase I de Abraxane® em combinação com Gemcitabina
59.	ABX + Gefitinib	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4 Gefitinib partindo de 1000 mg/d x 2	Tumores sólidos avançados	Estudo de fase I de escalação da dose de quimiosensibilização a gefitinib por pulsos dados antes de Abraxane® semanal
60.	ABX + Avastin®		Melanoma Metastático	Estudo de fase II de Abraxane® e Avastin® em melanoma metastático
61.	ABX + Avastin®		Melanoma	Abraxane® e Avastin® como terapia para pacientes com melanoma maligno
62.	ABX + Carboplatina		Melanoma Metastático	Estudo de fase II de Abraxane® e carboplatina em melanoma metastático
63.	ABX + Sorafenib + Carboplatina	ABX: qwk Sorafenib: D2-19 Carbo: AUC = 6 D1	Melanoma Metastático	Estudo de fase II de Abraxane® em combinação com carboplatina e sorafenib em melanoma metastático
64.	ABX + Capecitabina		Cancro colorrectal metastático (após insucesso de terapia à base de oxaliplatina e terapia à base de Irinotecano)	Ensaio de fase II de Abraxane® em combinação com Xeloda® para pacientes anteriormente tratados com cancro colorrectal avançado ou metastático
65.	ABX + Gemcitabina	Semanalmente	Cancro pancreático	Estudo de fase I de Abraxane® em combinação com gemcitabina em cancro pancreático

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do Protocolo
66.	ABX + Gemcitabina	ABX + Gem vs Gem	Cancro pancreático	Ensaio para registo de fase III em cancro pancreático
67.	ABX + agentes antiangiogénicos			Abraxane® combinado com agentes antiangiogénicos, e.g. Avastin
68.	ABX + inibidores de proteassomas			Abraxane® combinado com inibidores de proteassomas, e.g. Velcade®
69.	ABX + inibidores de EGFR			Abraxane® combinado com inibidores de EGFR, e.g. Tarceva®

Como aqui se utiliza (por exemplo na Tabela 1), ABX refere-se a Abraxane®; GW572016 refere-se a lapatinib; Xeloda refere-se a capecitabina ou Xeloda®; bevacizumab é também conhecido como Avastin®; trastuzumab é também conhecido como Herceptin®; pemtrexed é também conhecido como Alimta®; cetuximab é também conhecido como Erbitux®; gefitinib é também conhecido como Iressa®; FEC refere-se a uma combinação de 5-fluorouracilo, Epirubicina e Ciclofosfamida; AC refere-se a uma combinação de Adriamicina mais Ciclofosfamida; TAC refere-se a um regime adjuvante para cancro da mama aprovado pela FDA; RAD001 refere-se a um derivado de rapamicina; CPCNP refere-se a cancro do pulmão de células não pequenas; e CPCP refere-se a cancro do pulmão de células pequenas.

Como aqui se utiliza (por exemplo na Tabela 1), AUC refere-se à área sob a curva; q4wk refere-se a uma dose a cada 4 semanas; q3wk refere-se a uma dose a cada 3 semanas; q2wk refere-se a uma dose a cada 2 semanas; qwk refere-se a uma dose semanal; qwk x 3/4 refere-se a uma dose semanal durante 3 semanas com a 4.ª semana de folga; qwk x 2/3 refere-se a uma dose semanal durante 2 semanas com a 3.ª semana de folga.

**Terapia de combinação com terapia de radiação e cirurgia  
(apenas para referência)**

É aqui descrito para referência um método de tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro) compreendendo uma primeira terapia compreendendo a administração de um taxano (particularmente nanopartículas compreendendo um taxano) e uma proteína transportadora e uma terapia segunda compreendendo radiação e/ou cirurgia.

Em algumas variações, o método compreende: a) uma primeira terapia compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo uma quantidade eficaz de um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina) e b) uma segunda terapia compreendendo terapia de radiação, cirurgia, ou suas combinações. Em algumas variações, o taxano está revestido com a proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, a segunda terapia é terapia de radiação. Em algumas variações, a segunda terapia é cirurgia.

Em algumas variações, o método compreende a) uma primeira terapia compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina; e b) uma segunda terapia compreendendo terapia de radiação, cirurgia, ou suas combinações. Em algumas variações, a segunda terapia é terapia de radiação. Em algumas variações, a segunda terapia é cirurgia. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, a composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, a razão em peso entre a albumina e o paclitaxel na composição é cerca de 18:1 ou inferior, tal como cerca de 9:1 ou inferior. Em algumas variações, o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e a composição de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e o paclitaxel

está revestido com albumina. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é Abraxane®.

A administração da composição de nanopartículas pode ser anterior à radiação e/ou à cirurgia, após a radiação e/ou a cirurgia, ou concorrente com a radiação e/ou a cirurgia. Por exemplo, a administração da composição de nanopartículas pode preceder ou seguir-se à terapia de radiação e/ou de cirurgia com intervalos que variam desde minutos a semanas. Em algumas variações, o período de tempo entre a primeira e a segunda terapias é tal que taxano e a radiação/cirurgia possam ainda exercer um efeito vantajosamente combinado sobre a célula. Por exemplo, o taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas pode ser administrado menos de cerca de qualquer de 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 horas antes da radiação e/ou da cirurgia. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada menos de cerca de 9 horas antes da radiação e/ou da cirurgia. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada menos de cerca de qualquer de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 dias antes da radiação/cirurgia. Em algumas variações, o taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas é administrado menos de cerca de qualquer de 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108, ou 120 horas após a radiação e/ou cirurgia. Em algumas variações, pode ser desejável estender o período de tempo para o tratamento significativamente, onde passam vários dias a várias semanas entre as duas terapias.

A radiação aqui contemplada inclui, por exemplo, raios-raios-x (feixe externo), e a entrega direcionada de radioisótopos a células tumorais. Outras formas de factores que danificam o ADN estão também contempladas tais como micro-ondas e irradiação UV. A radiação pode ser dada num única dose ou numa série de pequenas doses num programa de doses fraccionadas. A quantidade de radiação aqui contemplada varia de cerca de 1 a cerca de 100 Gy, incluindo, por exemplo, cerca de 5 a cerca de 80, cerca de 10 a cerca de 50 Gy, ou cerca de 10 Gy. A dose total pode ser aplicada num regime fraccionado. Por exemplo, o regime pode compreender doses individuais fraccionadas de 2 Gy. A dosagem varia grandemente para os

radioisótopos, e depende da semivida do isótopo e da força e tipo de radiação emitida.

Quando a radiação comprehende a utilização de isótopos radioactivos, o isótopo pode ser conjugado com um agente de direcccionamento, tal como um anticorpo terapêutico, que transporta o radionucleórido para o tecido alvo. Os isótopos radioactivos adequados incluem, mas não se lhes limitando, astatina<sup>211</sup>, <sup>14</sup>carbono, <sup>51</sup>crómio, <sup>36</sup>cloro, <sup>57</sup>ferro, <sup>58</sup>cobalto, cobre<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, gálio<sup>67</sup>, <sup>3</sup>hidrogénio, iodo<sup>123</sup>, iodo<sup>131</sup>, índio<sup>111</sup>, <sup>59</sup>ferro, <sup>32</sup>fósforo, rénio<sup>186</sup>, <sup>75</sup>selénio, <sup>35</sup>enxofre, tecnécio<sup>99m</sup>, e/ou ítrio<sup>90</sup>.

Em algumas variações, é aplicada radiação suficiente ao indivíduo para permitir a redução da dose normal do taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas necessária para efectuar o mesmo grau de tratamento em pelo menos cerca de qualquer de 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou mais. Em algumas variações, é administrado taxano na composição de nanopartículas suficiente para permitir a redução da dose normal da radiação necessária para efectuar o mesmo grau de tratamento em pelo menos cerca de qualquer de 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou mais. Em algumas variações, tanto a dose do taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas como a da radiação são reduzidas em comparação com as correspondentes doses normais de cada um quando utilizados isoladamente.

Em algumas variações, a combinação da administração da composição de nanopartículas e da terapia de radiação produzem um efeito supra-aditivo. Em algumas variações, o taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas é administrado uma vez na dose de 90 mg/kg, e a radiação é aplicada cinco vezes a 80 Gy diariamente.

A cirurgia aqui descrita inclui a ressecção em que a totalidade ou parte do tecido canceroso é fisicamente removido, excisado e/ou destruído. A ressecção de um tumor refere-se à remoção física de pelo menos parte de um tumor. Em adição à ressecção do tumor, o tratamento por cirurgia inclui cirurgia a laser, criocirurgia, electrocirurgia e cirurgia controlada microscopicamente (cirurgia de Mohs). A remoção de

cirurgia superficial, pré-cancros ou tecidos normais estão também contempladas.

A terapia de radiação e/ou a cirurgia podem ser realizadas em adição à administração de agentes quimioterapêuticos. Por exemplo, o indivíduo pode primeiro receber a administração de uma composição de nanopartículas contendo taxano e pelo menos um outro agente quimioterapêutico, e subsequentemente ser submetido a terapia de radiação e/ou cirurgia. Alternativamente, o indivíduo pode primeiro ser tratado com terapia de radiação e/ou cirurgia, que é depois seguida pela administração de uma composição de nanopartículas e pelo menos um outro agente quimioterapêutico. Outras combinações estão também contempladas.

A administração de composições de nanopartículas acima divulgada em conjunto com a administração de um agente quimioterapêutico é igualmente aplicável em conjunto com terapia de radiação e/ou cirurgia.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas do taxano e/ou o agente quimioterapêutico são administrados em conjunto com radiação de acordo com quaisquer dos regimes de dosagem descritos na Tabela 2.

Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de CPCNP num indivíduo compreende a) uma primeira terapia compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina; e b) uma segunda terapia compreendendo radiação conforme proporcionado nas Linhas 1 a 5 da Tabela 2. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 1 a 5 da Tabela 2.

Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro da cabeça e pescoço num indivíduo compreende a) uma primeira terapia compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina; e b) uma segunda terapia compreendendo radiação conforme proporcionado nas Linhas 6 a 9 da Tabela 2. Em

algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser em quaisquer dos regimes de dosagem indicados nas Linhas 6 a 9 da Tabela 2.

Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro pancreático num indivíduo compreende a) uma primeira terapia compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina; e b) uma segunda terapia compreendendo radiação conforme proporcionado na Linha 10 da Tabela 2. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser no regime de dosagem indicado na Linha 10 da Tabela 2.

Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de malignidades gástricas num indivíduo compreende a) uma primeira terapia compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano (tal como paclitaxel) e uma albumina; e b) uma segunda terapia compreendendo radiação conforme proporcionado na Linha 11 da Tabela 2. Em algumas variações, a administração da composição de nanopartículas e a do agente quimioterapêutico podem ser no regime de dosagem indicado na Linha 11 da Tabela 2.

TABELA 2

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do protocolo
1	ABX + Radiação		CPCNP	Ensaio de fase I/II de Abraxane® combinado com radiação
2	ABX + Carboplatina + Radiação		CPCNP	Ensaio de fase I/II de Abraxane® e carboplatina combinados com radiação.
3	ABX + Carboplatina + Radiação	1 ciclo de indução por ABX/Carbo seguido por pulsos de ABX 2 ou 3 vezes por semana + radiação	CPCNP	Quimiorradiação de fase II em CPCNP

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do protocolo
4	ABX + Carboplatina + Radiação		CPCNP	Indução por Abraxane®/carboplatina seguidos por Abraxane® + radiação em pacientes de CPCNP de estádio III A&B PS2
5	ABX + Carboplatina + Radiação	ABX qwk + carbo + radiação seguidos por ABX q3wk + carbo	CPCNP	Estudo de fase II
6	ABX + Radiação		Cancro da cabeça e pescoço	Abraxane® como radiosensibilizador no cancro da cabeça e pescoço
7	ABX + Cetuximab + Radiação		Cancro da cabeça e pescoço	Fase I/II, Abraxane® em combinação com cetuximab e radiação
8	ABX + Carboplatina + 5-FU + Hidroxiureia + Radiação	Indução: ABX 135 mg/m <sup>2</sup> qwk + carbo: AUC = 2 seguidos por Quimiorradiação concorrente: ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> 5-FU: 600 mg/m <sup>2</sup> hidroxiureia: 5000 mg BID	Cancro da cabeça e pescoço	estudo de fase I/II de quimioterapia de indução com Abraxane® e carboplatina seguidos de fluorouracilo concomitante, hidroxiureia, Abraxane® e IMRT para cancros da cabeça e pescoço localmente avançados
9	ABX + Carboplatina + Erbitux® + Radiação	ABX: 20-50 mg/m <sup>2</sup> qwk x 7 escalação da dose Erbitux®: 400 mg/m <sup>2</sup> dia 7, 250 mg/m <sup>2</sup> qwk x 7 Carbo: AUC = 1.5 qwk x 7 IMRT	Cancro da cabeça e pescoço localmente avançado	Ensaio de fase I de Abraxane® em combinação com carboplatina, cetuximab e IMRT em cancro de células escamosas da cabeça e pescoço localmente avançado
10	ABX + Gemcitabina + Radiação	qwk	Cancro pancreático	Um ensaio de fase II randomizado de gemcitabina semanal, Abraxane®, e irradiação externa para cancro pancreático localmente avançado

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do protocolo
11	ABX + Cisplatina + Radiação		Malignidades gástricas	Fase I/II, combinação de Abraxane®/cisplatina e radiação para pacientes com malignidades gástricas/GEJ ressecionadas.

Em algumas variações, são aqui descritas composições farmacêuticas compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (tal como paclitaxel) e uma proteína transportadora (tal como albumina) para utilização no tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro), em que a referida utilização compreende uma segunda terapia compreendendo terapia de radiação, cirurgia, ou suas combinações.

### **Terapia metronómica**

No âmbito da invenção, pode ser aplicado um regime de terapia metronómica.

"Regime de dosagem metronómica", como aqui se utiliza, refere-se à administração frequente de um taxano sem folgas prolongadas numa dose inferior à dose máxima tolerada estabelecida através de um programa tradicional com folgas (aqui adiante também referido como "programa com DMT padrão" ou um "regime com DMT padrão"). Na dosagem metronómica, pode ultimamente ser administrada a mesma dose, uma dose inferior, ou superior cumulativa ao longo de um determinado período de tempo, à que seria administrada através de um programa com DMT padrão. Em alguns casos, isto é conseguido estendendo a moldura e/ou a frequência temporais durante os quais o regime de dosagem é conduzido enquanto diminuindo a quantidade administrada em cada dose. Geralmente, o taxano administrado através do regime de dosagem metronómica da presente invenção é mais bem tolerado pelo indivíduo. A dosagem metronómica pode também ser referida como uma dosagem de manutenção ou dosagem crónica.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora é

administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25% a cerca de 25% da sua dose máxima tolerada seguindo um regime de dosagem tradicional. Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo um taxano e uma albumina é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25% a cerca de 25% da sua dose máxima tolerada seguindo um regime de dosagem tradicional.

Em algumas variações, a dosagem do taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas por administração é inferior a cerca de qualquer de 1%, 2%, 3&, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 18%, 20%, 22%, 24%, ou 25% da DMT para o mesmo taxano (tal como paclitaxel) na mesma formulação seguindo um determinado esquema de dosagem tradicional. Esquema de dosagem tradicional refere-se ao esquema de dosagem que é geralmente estabelecido num cenário clínico. Por exemplo, a tradição do esquema de dosagem para o Abraxane® é um programa 3-semanal, i.e., administração da composição de três em três semanas.

Em algumas variações, a dosagem do taxano (tal como paclitaxel) por administração está entre cerca de 0,25% a cerca de 25% do correspondente valor da DMT, incluindo por exemplo qualquer de cerca de 0,25% a cerca de 20%, cerca de 0,25% a cerca de 15%, cerca de 0,25% a cerca de 10%, cerca de 0,25% a cerca de 20%, e cerca de 0,25% a cerca de 25%, do correspondente valor da DMT. O valor da DMT para um taxano seguindo um esquema de dosagem tradicional é conhecido ou pode ser facilmente determinado por um perito na especialidade. Por exemplo, o valor da DMT quando o Abraxane® é administrado seguindo um esquema de dosagem tradicional a cada três semanas é cerca de 300 mg/m<sup>2</sup>.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a

cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $25 \text{ mg/m}^2$ . Em algumas variações, é proporcionado um método de administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina, em que a composição de nanopartículas é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $25 \text{ mg/m}^2$ .

Em algumas variações, a dose do taxano (tal como paclitaxel) em cada administração é inferior a cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 22, 25 e  $30 \text{ mg/m}^2$ . Por exemplo, a dose do taxano (tal como paclitaxel) pode variar de cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $30 \text{ mg/m}^2$ , cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $25 \text{ mg/m}^2$ , cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $15 \text{ mg/m}^2$ , cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $10 \text{ mg/m}^2$ , e cerca de  $0,25 \text{ mg/m}^2$  a cerca de  $5 \text{ mg/m}^2$ .

A frequência de dosagem para o taxano (tal como paclitaxel) na composição de nanopartículas inclui, mas não se lhes limitando, pelo menos cerca de qualquer de uma vez por semana, duas vezes por semana, três vezes por semana, quatro times a semana, cinco vezes por semana, seis vezes por semana, ou diariamente. Tipicamente, o intervalo entre cada administração é inferior a cerca de uma semana, tal como inferior a cerca de qualquer de 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 dia. Em algumas variações, o intervalo entre cada administração é constante. Por exemplo, a administração pode ser realizada diariamente, de dois em dois dias, de três em três dias, de quatro em quatro dias, de cinco em cinco dias, ou semanalmente. Em algumas variações, a administração pode ser realizada duas vezes por dia, três vezes por dia ou mais frequentemente.

Os regimes de dosagem metronómica aqui descritos podem ser estendidos ao longo de um período de tempo prolongado, tal como de cerca de um mês até cerca de três anos. Por exemplo, o regime de dosagem pode ser estendido ao longo de um período de qualquer de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, e 36 meses. Geralmente, não há folgas no esquema de dosagem.

A dose cumulativa do taxano (tal como paclitaxel) administrado pelo regime metronómico pode ser superior à do taxano administrado de acordo com um esquema de dosagem com DMT padrão ao longo do mesmo período de tempo. Em algumas variações, a dose cumulativa do taxano administrado pelo regime metronómico é igual ou é inferior à do taxano administrado de acordo com um esquema de dosagem com DMT padrão ao longo do mesmo período de tempo.

Entenda-se que os ensinamentos aqui proporcionados são apenas exemplos, e que o regime de dosagem metronómica pode ser desenhado rotineiramente de acordo com os ensinamentos aqui proporcionados e com base no programa padrão da DMT individual, e que o regime de dosagem metronómica utilizado nestas experiências serve meramente de exemplo de possíveis alterações no intervalo e duração da dosagem que são feitas a um programa com a DMT padrão para chegar a um regime de dosagem metronómica óptimo.

O regime de dosagem metronómica aqui descrito pode ser utilizado sozinho como tratamento de uma doença proliferativa, ou ser realizado no contexto de uma terapia de combinação, tal como as terapias de combinação aqui descritas. Em algumas variações, a terapia no regime de dosagem metronómica pode ser utilizada em combinação ou em conjunto com outras terapias estabelecidas administradas através de regimes com DMT padrão. Por "em combinação ou em conjunto com" entenda-se que o regime de dosagem metronómica da presente invenção é conduzido ao mesmo tempo que o regime com DMT padrão de terapias estabelecidas, ou entre os cursos de terapia de indução para sustentar o benefício acrescido para o indivíduo pela terapia de indução, em que a intenção é continuar a inibir o crescimento tumoral sem comprometer indevidamente a saúde do indivíduo ou a capacidade do indivíduo suportar o curso seguinte de terapia de indução. Por exemplo, pode ser adoptado um regime de dosagem metronómica após um curso inicial curto de quimioterapia com DMT.

As composições de nanopartículas administradas com base no regime de dosagem metronómica aqui descrito podem ser administradas a um indivíduo (tal como um ser humano) através

de várias vias, tais como as vias parentérica, incluindo intravenosa, intra-arterial, intrapulmonar, oral, por inalação, intravesicular, intramuscular, intratraqueal, subcutânea, intra-ocular, intratecal ou transdérmica. Por exemplo, a composição de nanopartículas pode ser administrada por inalação para tratar condições do tracto respiratório. A composição pode ser utilizada para tratar condições respiratórias tais como fibrose pulmonar, bronqueolite obliterante, cancro do pulmão, carcinoma bronqueoalveolar, e similares. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é administrada oralmente.

Algumas variações exemplificativas variadas são aqui proporcionadas.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25% a cerca de 25% da sua dose máxima tolerada seguindo um regime de dosagem tradicional. Em algumas variações, o taxano está revestido com a proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, a dose do taxano por administração é inferior a cerca de qualquer de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 18%, 20%, 22%, 24%, ou 25% da dose máxima tolerada. Em algumas variações, o taxano é administrado pelo menos cerca de qualquer de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x (*i.e.*, diariamente) por semana. Em algumas variações, os intervalos entre cada administração são inferiores a cerca de qualquer de 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias e 1 dia. Em algumas variações, o taxano é administrado ao longo de um período de pelo menos cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 e 36 meses.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo um taxano e uma albumina é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25% a cerca de 25% da sua dose máxima tolerada seguindo um regime de

dosagem tradicional. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, a composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, a razão em peso entre a albumina e o paclitaxel na composição é cerca de 18:1 ou inferior, tal como cerca de 9:1 ou inferior. Em algumas variações, o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e a composição de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é Abraxane®.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 25 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano está revestido com a proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, a dose do taxano por administração é inferior a cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 22 e 25 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, o taxano é administrado pelo menos cerca de qualquer de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x (*i.e.*, diariamente) por semana. Em algumas variações, os intervalos entre cada administração são inferiores a cerca de qualquer de 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias e 1 dia. Em algumas variações, o taxano é administrado ao longo de um período de pelo menos cerca de qualquer de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 e 36 meses.

Em algumas variações, a composição de nanopartículas compreendendo paclitaxel e a albumina é administrada ao longo de um período de pelo menos um mês, em que o intervalo entre cada administração não é superior a cerca de uma semana, e em

que a dose do taxano em cada administração é cerca de 0,25 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 25 mg/m<sup>2</sup>. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, a composição de nanopartículas de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, a razão em peso entre a albumina e o paclitaxel na composição é cerca de 18:1 ou inferior, tal como cerca de 9:1 ou inferior. Em algumas variações, o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e a composição de paclitaxel/albumina está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivo (tal como Cremophor). Em algumas variações, as nanopartículas de paclitaxel/albumina possuem um diâmetro médio não superior a cerca de 200 nm e o paclitaxel está revestido com albumina. Em algumas variações, a composição de nanopartículas é Abraxane®.

Em algumas variações, o Abraxane® (ou outras composições de nanopartículas de paclitaxel/albumina) é administrada numa dose de cerca de 3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg diariamente. Em algumas variações, o Abraxane® é administrado na dose de cerca de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg diariamente. Em algumas variações, o Abraxane® é administrado na dose de cerca de 6 mg/kg diariamente. Em algumas variações, o Abraxane® é administrado na dose de cerca de 3 mg/kg diariamente.

### **Outros aspectos da divulgação**

Noutros aspectos, são aqui descritos métodos de tratamento de doenças proliferativas compreendendo a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano (incluindo paclitaxel, docetaxel ou ortataxel) e uma proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro compreendendo a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo ortataxel e uma proteína transportadora (tal como albumina).

Em algumas variações, são aqui descritos métodos de tratamento de doenças proliferativas compreendendo a administração de uma composição compreendendo nanopartículas

compreendendo uma tiocolchicina ou um seu derivado (tal como tiocolchicina dimérica) e uma proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, são aqui descritos métodos de tratamento de cancro compreendendo a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo colchicinas diméricas e uma proteína transportadora (tal como albumina). Em algumas variações, a composição de nanopartículas é qualquer de (e em algumas variações seleccionada do grupo que consiste em) Nab-5404, Nab-5800 e Nab-5801.

Em algumas variações, é aqui descrito um método de tratamento de cancro compreendendo a administração de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel, em que a composição de nanopartículas é administrada de acordo com quaisquer dos regimes de dosagem descritos na Tabela 3. Em algumas variações, o cancro é um cancro da mama metastático refractário a taxanos.

TABELA 3

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do protocolo
1.	ABX sozinho	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4	Cancro da mama metastático	Estudo de fase II com tratamento semanal com Abraxane® em pacientes de CMM refractário a taxanos
2.	ABX sozinho	Braço 1: ABX 130 mg/m <sup>2</sup> qwk Braço 2: ABX 260 mg/m <sup>2</sup> q2wk Braço 3: ABX 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk	Cancro da mama metastático	ensaio de fase II de 3 braços em pacientes de CMM Her-2- em 1.ª linha.
3.	ABX sozinho (Capxol)	ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk vs Taxol: 175 mg/m <sup>2</sup> q3wk	Cancro da mama metastático	Estudo de fase II controlado, randomizado, sem ocultação, para avaliar a eficácia e a segurança de Capxol (uma Nanopartícula de Paclitaxel sem Cremophor) e injeção de paclitaxel formulado com Cremophor em Pacientes com cancro da mama metastático

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do protocolo
4.	ABX sozinho	Braço 1: ABX semanal Braço 2: ABX q3wk Braço 3: Taxol semanal	Cancro da mama metastático	Ensaio de fase II de 3 braços em CMM em 1.ª linha e 2.ª linha, com análise de correlativos biológicos
5.	ABX sozinho	ABX: 300 mg/m <sup>2</sup> q3wk	cancro da mama de estádio IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV	Ensaio de fase II de quimioterapia neo-adjuvante (NCT) com nanopartículas de paclitaxel (ABX-007, Abraxane®) em mulheres com cancros da mama de estádio clínico IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV (com primário intacto)
6.	ABX sozinho	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4	CPCNP avançado, 1.ª linha	Estudo de fase I/II de monoterapia com Abraxane® em CPCNP avançado em 1.ª linha
7.	ABX sozinho	ABX 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk	CPCNP, 1.ª linha	Fase II, ABX mono em CPCNP em 1.ª linha
8.	ABX sozinho	Braço 1: ABX q3wk Braço 2: ABX qwk Doses TBD	CPCNP, 2.ª linha	Estudo de fase II de monoterapia com Abraxane® em CPCNP em 2.ª linha
9.	ABX sozinho	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk vs ABX: 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk	Cancro da próstata	Estudo de fase II randomizado de Abraxane® semanal vs de três em três semanas em CPRH, primeira linha
10.	ABX sozinho	ABX qwk	Cancro da próstata	Fase II, Abraxane® em cancro da próstata, 1.ª linha
11.	ABX sozinho	ABX: 150 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4 durante 2 ciclos	Cancro da próstata	Estudo de fase II neo-adjuvante
12.	ABX sozinho	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> qwk (sem folgas)	Cancro da próstata	Fase II, Abraxane®, 100 mg, semanal sem folgas

Linha n.º	Combinação	Regime/Dosagem	Tipo de terapia em estudo	Título do protocolo
13.	ABX sozinho	ABX: 100 mg/m <sup>2</sup> (anteriormente tratado) ABX: 150 mg/m <sup>2</sup> (não tratado) qwk x 3/4	Melanoma maligno	Fase II, pacientes de melanoma metastático anteriormente tratados e não tratados
14.	ABX sozinho	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> qwk x 3/4	Carcinoma do cérvix	Estudo de fase II de Abraxane® em tratamento de carcinoma do cérvix persistente ou recorrente
15.	ABX sozinho		Cancro ovariano	Estudo de fase II de Abraxane® para tratamento de cancro ovariano avançado (3.ª linha)
16.	ABX sozinho (ABI-007)		malignidades não hematológicas	Fase II, uso de tratamento único com ABI-007 (Abraxane®) para o tratamento de malignidades não hematológicas. Utilização compassiva

### Composições de nanopartículas

As composições de nanopartículas aqui descritas compreendem nanopartículas compreendendo (em várias variações consistindo essencialmente em) um taxano (tal como paclitaxel) e uma proteína transportadora (tal como albumina). Nanopartículas de fármacos fracamente solúveis em água (tais como o taxano) foram divulgadas, por exemplo, nas Pat. U.S. 5,916,596; 6,506,405; e 6,537,579 e também na Pub. de Pat. U.S. 2005/0004002A1. Embora a descrição proporcionada adiante seja específica para o taxano, deve entender-se que o mesmo se aplica para outros fármacos, tais como rapamicina, 17-AAG e tiocolchicina dimérica.

Em algumas variações, a composição compreende nanopartículas com um diâmetro médio, ou em média, não superior a cerca de 1000 nanómetros (nm), tal como não superior a cerca de qualquer de 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 nm. Em algumas variações, o diâmetro médio, ou

em média, das nanopartículas não é superior a cerca de 200 nm. Em algumas variações, o diâmetro médio, ou em média, das nanopartículas não é superior a cerca de 150 nm. Em algumas variações, o diâmetro médio, ou em média, das nanopartículas não é superior a cerca de 100 nm. Em algumas variações, o diâmetro médio, ou em média, das nanopartículas é cerca de 20 a cerca de 400 nm. Em algumas variações, o diâmetro médio, ou em média, das nanopartículas é cerca de 40 a cerca de 200 nm. Em algumas variações, as nanopartículas são esterilizáveis por filtração.

As nanopartículas aqui descritas podem estar presentes numa formulação seca (tal como uma composição liofilizada) ou suspensas num meio biocompatível. Os meios biocompatíveis adequados incluem, mas não se lhes limitando, água, meios aquosos tamponados, sol. salina, sol. Salina tamponada, soluções de aminoácidos opcionalmente tamponadas, soluções de proteínas opcionalmente tamponadas, soluções de açúcares opcionalmente tamponadas, soluções de vitaminas opcionalmente tamponadas, soluções de polímeros sintéticos opcionalmente tamponadas, emulsões contendo lípidos, e similares.

O termo "proteínas" refere-se a polipéptidos ou polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento (incluindo comprimento completo ou fragmentos), que podem ser lineares ou ramificados, compreender aminoácidos modificados, e/ou estar interrompidos por não-aminoácidos. O termo também abrange um polímero de aminoácidos que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligações dissulfureto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação. Estão também incluídos neste termo, por exemplo, polipéptidos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), assim como outras modificações conhecidas na especialidade. As proteínas aqui descritas podem ser de ocorrência natural, i.e., obtidas ou derivadas de uma fonte natural (tal como sangue), ou sintetizadas (tal como quimicamente sintetizadas ou sintetizadas por técnicas de ADN recombinante).

Os exemplos de proteínas transportadoras adequadas incluem proteínas normalmente encontradas no sangue ou no

plasma, que incluem, mas não se lhes limitando, albumina, imunoglobulina incluindo IgA, lipoproteínas, apolipoproteína B, glicoproteína alfa-ácida, beta-2-macroglobulina, tiroglobulina, transferrina, fibronectina, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, e similares. Em algumas variações, a proteína transportadora é uma proteína não sanguínea, tal como caseína, -lactalbumina e -lactoglobulina. As proteínas transportadoras podem ser de origem natural ou preparadas sinteticamente. Em algumas variações, o transportador farmaceuticamente aceitável comprehende albumina, tal como albumina sérica humana. A albumina sérica humana (HSA) é uma proteína globular altamente solúvel de  $M_r$  65K e consiste em 585 aminoácidos. A HSA é a proteína mais abundante no plasma e é responsável por 70-80% da pressão osmótica colóide do plasma humano. A sequência de aminoácidos da HSA contém um total de 17 pontes de dissulfureto, um tiol livre (Cys 34), e um único triptofano (Trp 214). A utilização intravenosa de solução de HSA foi indicada para a prevenção e tratamento de choque hipovolêmico (veja-se, e.g., Tullis, JAMA, 237, 355-360, 460-463, (1977)) e Houser et al., *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 150, 811-816 (1980)) e em conjunto com transfusão de permuta no tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal (veja-se, e.g., Finlayson, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 6, 85-120, (1980)). Outras albuminas estão contempladas, tal como albumina sérica bovina. A utilização destas albuminas não humanas pode ser apropriada, por exemplo, no contexto da utilização destas composições em mamíferos não humanos, tais como veterinário (incluindo no contexto de animais domésticos de estimação e agrícolas).

A albumina sérica humana (HSA) possui múltiplos locais de ligação hidrófobos (um total de oito para ácidos gordos, um ligando endógeno de HSA) e liga-se a um conjunto diverso de taxanos, especialmente compostos hidrófobos neutros e negativamente carregados (Goodman et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed, McGraw-Hill New York (1996)). Foram propostos dois locais de ligação de alta afinidade nos subdomínios IIA e IIIA de HSA, que são bolsas hidrófobas altamente alongadas com resíduos carregados de lisina e arginina próximo da superfície que funcionam como pontos de fixação para ligandos de características polares (veja-se,

e.g., Fehske et al., *Biochem. Pharmacol.*, 30, 687-92 (198a), Vorum, *Dan. Med. Bull.*, 46, 379-99 (1999), Kragh-Hansen, *Dan. Med. Bull.*, 1441, 131-40 (1990), Curry et al., *Nat. Struct. Biol.*, 5, 827-35 (1998), Sugio et al., *Protein Eng.*, 12, 439-46 (1999), He et al., *Nature*, 358, 209-15 (199b), e Carter et al., *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203 (1994)). Mostrou-se que o paclitaxel e o propofol se ligam a HSA (veja-se, e.g., Paal et al., *Eur. J. Biochem.*, 268(7), 2187-91 (200a), Purcell et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1478(a), 61-8 (2000), Altmayer et al., *Arzneimittelforschung*, 45, 1053-6 (1995), e Garrido et al., *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.*, 41, 308-12 (1994)). Em adição, mostrou-se que o docetaxel se liga a proteínas plasmáticas humanas (veja-se, e.g., Urien et al., *Invest. New Drugs*, 14(b), 147-51 (1996)).

A proteína transportadora (tal como albumina) na composição geralmente serve como um transportador para o taxano, i.e., a proteína transportadora na composição torna o taxano mais prontamente suspensível num meio aquoso ou ajuda a manter a suspensão em comparação com composições que não compreendem uma proteína transportadora. Isto pode evitar a utilização de solventes tóxicos (ou tensioactivos) para a solubilização do taxano, e desse modo pode reduzir um ou mais efeitos secundários da administração do taxano a um indivíduo (tal como um ser humano). Assim, em algumas variações, a composição aqui descrita está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivos, tal como Cremophor (incluindo Cremophor EL® (BASF)). Em algumas variações, a composição de nanopartículas está substancialmente isenta (tal como isenta) de tensioactivos. A composição está "substancialmente isenta de Cremophor" ou "substancialmente isenta de tensioactivo" se a quantidade de Cremophor ou de tensioactivo na composição não é suficiente para causar um ou mais efeitos secundários num indivíduo quando a composição de nanopartículas é administrada ao indivíduo.

A quantidade de proteína transportadora na composição aqui descrita variará dependendo de outros componentes na composição. Em algumas variações, a composição compreende uma proteína transportadora numa quantidade que é suficiente para estabilizar o taxano numa suspensão aquosa, por exemplo, na forma de uma suspensão coloidal estável (tal como uma

suspensão estável de nanopartículas). Em algumas variações, a proteína transportadora está numa quantidade que reduz a velocidade de sedimentação do taxano num meio aquoso. Para composições contendo partículas, a quantidade da proteína transportadora também depende da dimensão e da densidade das nanopartículas do taxano.

Um taxano está "estabilizado" numa suspensão aquosa se permanece suspenso num meio aquoso (tal como sem precipitação ou sedimentação visíveis) durante um período de tempo prolongado, tal como durante pelo menos cerca de qualquer de 0,1, 0,2, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48, 60 ou 72 horas. A suspensão é geralmente, mas não necessariamente, adequada para administração a um indivíduo (tal como um ser humano). A estabilidade da suspensão é geralmente (mas não necessariamente) avaliada a uma temperatura de armazenagem (tal como a temperatura ambiente (tal como 20-25°C) ou condições refrigeradas (tais como 4°C). Por exemplo, uma suspensão é estável a uma temperatura de armazenagem se não exibe floculação ou aglomeração de partículas visíveis a olho nu ou quando visionada ao microscópio óptico a 1000 vezes, a cerca de quinze minutos após a preparação da suspensão. A estabilidade pode também ser avaliada sob condições de teste aceleradas, tais como a uma temperatura que é superior a cerca de 40°C.

Em algumas variações, a proteína transportadora está presente numa quantidade que é suficiente para estabilizar o taxano numa suspensão aquosa numa certa concentração. Por exemplo, a concentração do taxano na composição é cerca de 0,1 a cerca de 100 mg/ml, incluindo por exemplo qualquer de cerca de 0,1 a cerca de 50 mg/ml, cerca de 0,1 a cerca de 20 mg/ml, cerca de 1 a cerca de 10 mg/ml, cerca de 2 mg/ml a cerca de 8 mg/ml, cerca de 4 a cerca de 6 mg/ml, cerca de 5 mg /ml. Em algumas variações, a concentração do taxano é pelo menos cerca de qualquer de 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml e 50 mg/ml. Em algumas variações, a proteína transportadora está presente numa quantidade que evita a utilização de tensioactivos (tal como Cremophor), de modo que a composição

está isenta ou substancialmente isenta de tensioactivo (tal como Cremophor).

Em algumas variações, a composição, na forma líquida, compreende de cerca de 0,1% a cerca de 50% (p/v) (e.g. cerca de 0,5% (p/v), cerca de 5% (p/v), cerca de 10% (p/v), cerca de 15% (p/v), cerca de 20% (p/v), cerca de 30% (p/v), cerca de 40% (p/v) ou cerca de 50% (p/v)) de proteína transportadora. Em algumas variações, a composição, na forma líquida, compreende cerca de 0,5% a cerca de 5% (p/v) de proteína transportadora.

Em algumas variações, a razão em peso entre a proteína transportadora, e.g., albumina, e o taxano na composição de nanopartículas é tal que uma quantidade suficiente do taxano se ligue à célula, ou seja transportada pela célula. Embora a razão em peso entre a proteína transportadora e o taxano tenha que ser optimizada para diferentes combinações de proteína transportadora e taxano, geralmente a razão em peso entre a proteína transportadora, e.g., albumina, e o taxano (p/p) é cerca de 0,01:1 a cerca de 100:1, cerca de 0,02:1 a cerca de 50:1, cerca de 0,05:1 a cerca de 20:1, cerca de 0,1:1 a cerca de 20:1, cerca de 1:1 a cerca de 18:1, cerca de 2:1 a cerca de 15:1, cerca de 3:1 a cerca de 12:1, cerca de 4:1 a cerca de 10:1, cerca de 5:1 a cerca de 9:1, ou cerca de 9:1. Em algumas variações, a razão em peso entre a proteína transportadora e o taxano é cerca de qualquer de 18:1 ou inferior, 15:1 ou inferior, 14:1 ou inferior, 13:1 ou inferior, 12:1 ou inferior, 11:1 ou inferior, 10:1 ou inferior, 9:1 ou inferior, 8:1 ou inferior, 7:1 ou inferior, 6:1 ou inferior, 5:1 ou inferior, 4:1 ou inferior, e 3:1 ou inferior.

Em algumas variações, a proteína transportadora permite que a composição seja administrada a um indivíduo (tal como um ser humano) sem efeitos secundários significativos. Em algumas variações, a proteína transportadora (tal como albumina) está numa quantidade que é eficaz para reduzir um ou mais efeitos secundários da administração do taxano a um ser humano. A expressão "redução de um ou mais efeitos secundários da administração do taxano" refere-se à redução, alívio, eliminação, ou impedimento de um ou mais efeitos indesejáveis causados pelo taxano, assim como efeitos secundários causados

por veículos de entrega (tais como solventes que tornam os taxanos adequados para injecção) utilizados para entregar o taxano. Estes efeitos secundários incluem, por exemplo, mielossupressão, neurotoxicidade, hipersensibilidade, inflamação, irritação venosa, flebite, dor, irritação cutânea, neuropatia periférica, febre neutropénica, reacção anafiláctica, trombose venosa, extravasamento, e suas combinações. Estes efeitos secundários, contudo, são meramente exemplificativos e podem ser reduzidos outros efeitos secundários, ou combinações de efeitos secundários, associados aos taxanos.

Em algumas variações, a composição comprehende Abraxane®. Abraxane® é uma formulação de paclitaxel estabilizado por albumina humana USP, que pode ser disperso em solução fisiológica directamente injectável. Quando disperso num meio aquoso adequado tal como cloreto de sódio para injecção a 0,9% ou dextrose para injecção a 5%, o Abraxane® forma uma suspensão coloidal estável de paclitaxel. O tamanho médio de partícula das nanopartículas na suspensão coloidal é cerca de 130 nanómetros. Como a HSA é livremente solúvel em água, o Abraxane® pode ser reconstituído numa ampla gama de concentrações, variando desde diluído (0,1 mg/ml de paclitaxel) até concentrado (20 mg/ml de paclitaxel), incluindo por exemplo cerca de 2 mg/ml a cerca de 8 mg/ml, cerca de 5 mg/ml.

Os métodos de preparação de composições de nanopartículas são conhecidos na especialidade. Por exemplo, nanopartículas contendo taxanos (tal como paclitaxel) e proteína transportadora (tal como albumina) podem ser preparadas sob condições de elevadas forças de corte (e.g., ultra-sons, homogeneização sob pressão elevada, ou similares). Estes métodos estão divulgados em, por exemplo, nas Pat. U.S. 5,916,596; 6,506,405; e 6,537,579 e também na Pub. de Pat. U.S. 2005/0004002A1.

Resumidamente, o taxano (tal como docetaxel) é dissolvido num solvente orgânico, e a solução pode ser adicionada a uma solução de albumina sérica humana. A mistura é submetida a homogeneização sob pressão elevada. O solvente orgânico pode então ser removido por evaporação. A dispersão obtida pode ser

adicionalmente liofilizada. Os solventes orgânicos adequados incluem, por exemplo, cetonas, ésteres, éteres, solventes clorados, e outros solventes conhecidos na especialidade. Por exemplo, o solvente orgânico pode ser cloreto de metileno e clorofórmio/etanol (por exemplo numa razão de 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, ou 9:1).

### **Outros componentes nas composições de nanopartículas**

As nanopartículas aqui descritas podem estar presentes numa composição que inclui outros agentes, excipientes ou estabilizantes. Por exemplo, para aumentar a estabilidade aumentando o potencial zeta negativo das nanopartículas, podem ser adicionados certos componentes carregados negativamente. Estes componentes carregados negativamente incluem, mas não se lhes limitando, sais biliares de ácidos biliares consistindo em ácido glicocólico, ácido cólico, ácido chenodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido glicochenodesoxicólico, ácido taurochenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido desidrocólico e outros; fosfolípidos incluindo fosfolípidos à base de lecitina (gema de ovo) que incluem as seguintes fosfatidilcolinas: palmitoíloleo oil-fosfatidilcolina, palmitoíl-linoleoilfosfatidilcolina, estearoíl-linoleoilfosfatidilcolina estearoíloleo oilfosfatidilcolina, estearoílaraquidoílfosfatidilcolina, e dipalmitoílfosfatidil-colina. Outros fosfolípidos incluindo L- -dimiristoíl-fosfatidilcolina (DMPC), dioleoílfosfatidilcolina (DOPC), diestearoílfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), e outros compostos relacionados. Tensioactivos ou emulsionantes carregados negativamente são também adequados como aditivos, e.g., colesterol sulfato de sódio e similares.

Em algumas variações, a composição é adequada para administração a um ser humano. Em algumas variações, a composição é adequada para administração a um mamífero tal como, no contexto veterinário, animais domésticos de estimação e de agricultura. Existe uma ampla variedade de formulações adequadas da composição de nanopartículas (veja-se, e.g., Pat. U.S. 5,916,596 e 6,096,331). As formulações e métodos seguintes são meramente exemplificativos e não são de nenhum

modo limitantes. As formulações adequadas para administração oral podem consistir em (a) soluções líquidas, tais como uma quantidade eficaz do composto dissolvida em diluentes, tais como água, sol. salina ou sumo de laranja, (b) cápsulas, saquetas ou comprimidos, cada um contendo uma quantidade predeterminada do ingrediente activo, sob a forma de sólidos ou grânulos, (c) suspensões num líquido apropriado, e (d) emulsões adequadas. As formas de comprimido podem incluir um ou mais de lactose, manitol, amido de milho, amido de batata, celulose microcristalina, goma-arábica, gelatina, dióxido de silício coloidal, croscarmelose de sódio, talco, estearato de magnésio, ácido esteárico, e outros excipientes, corantes, diluentes, agentes tamponantes, agentes humidificantes, conservantes, agentes aromatizantes, e excipientes farmacologicamente compatíveis. As formas de rebuçados podem compreender o ingrediente activo num aroma, usualmente sacarose e goma-arábica ou goma adragante, assim como pastilhas compreendendo o ingrediente activo numa base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e goma-arábica, emulsões, géis, e similares contendo, em adição ao ingrediente activo, excipientes que são conhecidos na especialidade.

Os exemplos de transportadores, excipientes e diluentes adequados incluem, mas não se lhes limitando, lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma-arábica, fosfato de cálcio, alginatos, goma adragante, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, água, solução salina, xarope, metilcelulose, metil- e propil-hidroxibenzoatos, talco, estearato de magnésio, e óleo mineral. As formulações podem adicionalmente incluir agentes lubrificantes, agentes molhantes, emulsionantes e agentes de suspensão, agentes conservantes, agentes edulcorantes ou agentes aromatizantes.

As formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções para injecção estéreis, aquosas e não aquosas, isotónicas, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos, e solutos que tornam a formulação compatível com o sangue do beneficiário pretendido, e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão, solubilizantes, agentes espessantes, estabilizantes e conservantes. As formulações podem ser apresentadas em

recipientes selados de dose unitária ou multidoses, tais como ampolas e frascos, e podem ser armazenadas numa condição criodessecada (lioofilizada) requerendo apenas a adição do excipiente líquido estéril, por exemplo, água para injecções, imediatamente antes da utilização. As soluções e suspensões extemporâneas para injecção podem ser preparadas a partir de pós, grânulos e comprimidos estéreis do tipo anteriormente descrito. As formulações injectáveis são preferidas.

Em algumas variações, a composição é formulada para ter uma gama de pH de cerca de 4,5 a cerca de 9,0, incluindo por exemplo gamas de pH de qualquer de cerca de 5,0 a cerca de 8,0, cerca de 6,5 a cerca de 7,5, e cerca de 6,5 a cerca de 7,0. Em algumas variações, a composição é formulada para ter um pH não inferior a cerca de 6, incluindo por exemplo não inferior a cerca de qualquer de 6,5, 7 ou 8 (tal como cerca de 8). A composição pode também ser preparada para ser isotónica com o sangue através da adição de um modificador da tonicidade adequado, tal como glicerol.

#### **Kits (apenas para referência)**

São aqui também descritos kits para utilização nos métodos divulgados. Os kits da invenção incluem um ou mais recipientes compreendendo composições de nanopartículas contendo taxano (ou formas de dosagem unitária e/ou artigos de fabrico) e/ou um agente quimioterapêutico, e em algumas variações, adicionalmente compreendem instruções de utilização de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos. O kit pode adicionalmente compreender uma descrição da selecção de um indivíduo ou tratamento adequados. As instruções fornecidas nos kits da invenção são tipicamente instruções escritas num rótulo ou bula de embalagem (e.g., uma folha de papel incluída no kit), mas são igualmente aceitáveis instruções legíveis por máquina (e.g., instruções suportadas num disco magnético ou óptico de armazenagem).

Em algumas variações, o kit compreende a) uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico, e c) instruções para administração das nanopartículas e dos agentes quimioterapêuticos simultaneamente e/ou sequencialmente, para

tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro). Em algumas variações, o taxano é qualquer de paclitaxel, docetaxel e ortataxel. Em algumas variações, o kit compreende nanopartículas compreendendo a) uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane®), b) uma quantidade eficaz de pelo menos um outro agente quimioterapêutico, e c) instruções para administração das nanopartículas e dos agentes quimioterapêuticos simultaneamente e/ou sequencialmente, para o tratamento eficaz de uma doença proliferativa (tal como cancro).

Em algumas variações, o kit compreende a) uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo um taxano e uma proteína transportadora (tal como albumina), b) uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo pelo menos um outro agente quimioterapêutico e uma proteína transportadora (tal como albumina), e c) instruções para administração das composições de nanopartículas simultaneamente e/ou sequencialmente, para tratamento de uma doença proliferativa (tal como cancro). Em algumas variações, o kit compreende nanopartículas compreendendo a) uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo paclitaxel e uma albumina (tal como Abraxane®, b) uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo pelo menos um outro agente quimioterapêutico e uma proteína transportadora (tal como albumina), e c) instruções para administração das composições de nanopartículas simultaneamente e/ou sequencialmente, para o tratamento eficaz de uma doença proliferativa (tal como cancro).

As nanopartículas e os agentes quimioterapêuticos podem estar presentes em recipientes separados ou num único recipiente. Entenda-se que o kit pode compreender uma composição distinta ou duas ou mais composições em que uma composição compreende nanopartículas e uma composição compreende um agente quimioterapêutico.

Os kits aqui descritos estão em embalagens adequadas. As embalagens adequadas incluem, mas não se lhes limitando, ampolas, garrafas, frascos, embalagens flexíveis (e.g., sacos Mylar ou de plástico selados), e similares. Os kits podem

opcionalmente proporcionar componentes adicionais tais como tampões e informação interpretativa.

As instruções relativas à utilização das composições de nanopartículas geralmente incluem informação quanto à dosagem, esquema de dosagem e via de administração para o tratamento pretendido. Os recipientes podem ser de doses unitárias, embalagens de granel (e.g., embalagens multidoses) ou doses sub-unitárias. Por exemplo, podem ser proporcionados *kits* que contêm dosagens suficientes do taxano (tal como taxano) como aqui divulgado para proporcionar um tratamento eficaz de um indivíduo durante um período prolongado, tal como qualquer de uma semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, ou mais. Os *kits* podem também incluir múltiplas doses unitárias do taxano e das composições farmacêuticas e instruções para utilização e podem ser embalados em quantidades suficientes para armazenagem e utilização em farmácias, por exemplo, farmácias hospitalares e farmácias de manipulação.

A invenção será agora descrita com maior detalhe por referência aos seguintes exemplos não limitantes.

### **EXEMPLOS**

**Exemplo 1. Resposta melhorada e toxicidades reduzidas para o Abraxane® comparativamente com Taxol® num estudo de Fase III de Abraxane® dado de três em três semanas (apenas para referência)**

Incidência significativamente reduzida de neutropenia e hipersensibilidade, ausência de necessidade de pré-medicação com esteróides, menor duração da neuropatia, menos tempo de infusão e maior dose.

O ABI-007 (Abraxane®), o primeiro paclitaxel ligado a albumina biologicamente interactivo numa forma de nanopartículas, isento de qualquer solvente, foi comparado com paclitaxel à base de Cremophor® (Taxol®) em indivíduos com cancro da mama metastático (CMM). Este estudo de fase III foi realizado para confirmar os estudos pré-clínicos que demonstram superior eficácia e reduzida toxicidade do ABI-007

quando comparados com o Taxol®. Os indivíduos foram aleatoriamente atribuídos a ciclos de 3 semanas de ABI-007 a 260 mg/m<sup>2</sup> (iv) ao longo de 30 minutos sem pré-medicação (n = 229) ou de Taxol® a 175 mg/m<sup>2</sup> IV ao longo de 3 horas com pré-medicação (n = 225). O ABI-007 demonstrou taxas de resposta significativamente superiores comparativamente com o Taxol® (33% vs. 19%; p = 0,001) e um tempo significativamente mais longo até à progressão do tumor (23,0 vs. 16,9 semanas; HR = 0,75; p = 0,006). Houve uma tendência para sobrevivência global mais longa em indivíduos que receberam o ABI-007 (65,0 vs. 55,7 semanas; p = 0,374). Numa análise não planeada, o ABI-007 melhorou a sobrevivência em indivíduos que receberam o tratamento como terapia de segunda linha ou mais (56,4 vs. 46,7 semanas; HR = 0,73; p = 0,024). A incidência de neutropenia de grau 4 foi significativamente inferior no grupo do ABI-007 (9% vs. 22%; p < 0,001) apesar de uma dose de paclitaxel 49% superior. A neuropatia sensorial de grau 3 foi mais comum no grupo do ABI-007 do que no grupo do Taxol® (10% vs. 2%; p < 0,001) mas foi facilmente gerida e mais rapidamente melhorada (mediana, 22 dias) do que para o Taxol® (mediana, 73 dias). Não ocorreram reacções de hipersensibilidade graves (grau 3 ou 4) relacionadas com o tratamento em nenhum dos indivíduos no grupo do ABI-007 apesar da ausência de pré-medicação e do tempo de administração mais curto. Em contraste, ocorreram reacções de hipersensibilidade de grau 3 no grupo do Taxol® apesar da pré-medicação padrão (dor no peito: 2 indivíduos; reacção alérgica: 3 indivíduos). Por protocolo, não foram administrados, por rotina, corticosteróides e anti-histamínicos aos indivíduos no grupo do ABI-007; contudo, foi administrada pré-medicação para emese, mialgia/artralgia ou anorexia a 18 indivíduos (8%) no grupo do ABI-007 em 2% dos ciclos de tratamento, enquanto no grupo do Taxol® 224 indivíduos (>99%) receberam pré-medicação em 95% dos ciclos. O único valor de química clínica que foi notavelmente diferente entre os 2 braços do tratamento foram os superiores níveis séricos de glucose nos indivíduos tratados com Taxol®, que também tiveram uma superior incidência de hiperglicemia reportada como EA (efeitos adversos) (15 [7%] vs. 3 [1%]; p = 0,003). Globalmente, o ABI-007 demonstrou eficácia superior e um perfil de segurança favorável comparativamente com o Taxol® nesta população de indivíduos. O índice terapêutico melhorado e a eliminação da

pré-medicação com esteróides necessária para taxanos à base de solventes torna este paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas um importante avanço no tratamento de CMM.

**Exemplo 2. Abraxane® Semanal em Indivíduos com Cancro da Mama Metastático Refractário ao Taxano (apenas para referência)**

Um recente estudo clínico de Fase II mostrou que a administração semanal de Abraxane® (paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas) numa dose de 125 mg/m<sup>2</sup> resultou num controlo da doença de longo prazo em indivíduos com cancro da mama metastático cuja doença tinha progredido enquanto estava a ser tratada com Taxol® ou Taxotere® (ou seja, indivíduos que são refractários ao taxano).

Crê-se que o Abraxane® representa a primeira composição biologicamente interactiva que explora a via mediada por receptores (gp60) que se verificou ser integral para atingir elevadas concentrações tumorais intracelulares do ingrediente activo - paclitaxel. O Estudo de fase II incluiu 75 indivíduos com cancro da mama metastático refractário aos taxanos. O Abraxane® foi administrado semanalmente através de uma infusão de 30 minutos a 125 mg/m<sup>2</sup> sem pré-medicação com esteróides/anti-histamínicos ou profilaxia de G-CSF. Os indivíduos receberam três doses semanais seguidas por uma semana de pausa, repetidas a cada 28 dias. Ao contrário do Taxol® ou do Taxotere®, que contêm detergentes que podem inibir a assimilação pelo tumor, o mecanismo de acção do paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas pode resultar em resultados melhorados, especialmente nesta população de indivíduos difíceis de tratar.

Especificamente, os dados mostraram que apesar desta elevada dose semanal de 125 mg/m<sup>2</sup> nesta população de indivíduos altamente pré-tratados e anteriormente expostos a taxano, apenas 3 de 75 indivíduos (4%) tiveram que descontinuar o Abraxane® devido a neuropatia periférica. Adicionalmente, daqueles que sofreram neuropatia periférica de Grau 3, 80% foram tipicamente capazes de voltar ao tratamento após uma pausa de apenas 1 ou 2 semanas e continuaram a receber Abraxane® numa dose reduzida durante uma média de 4 meses adicionais. Esta rápida melhoria foi consistente com a nossa observação no ensaio de Fase III - de que a neuropatia

periférica induzida por paclitaxel sozinho (*i.e.*, sem Cremophor®) melhora rapidamente em comparação com aquela que é induzida por Taxol®. Estas experiências de ensaio clínico do Abraxane® proporcionam a primeira oportunidade clínica para avaliar os efeitos do agente quimioterapêutico em si, paclitaxel, a partir dos efeitos daqueles em solventes. Com base e ambas as experiências, de Fase II e III, os dados sugerem agora que a neuropatia periférica devida ao Abraxane® não é comparável com a neuropatia periférica devida ao Taxol® ou ao Taxotere® relativamente à duração e ao impacto no indivíduo.

Em relação à experiência clínica da neuropatia periférica subsequente a Taxol® ou Taxotere®, a Abraxis Oncology completou recentemente um pesquisa com 200 oncologistas a quem foi perguntado quanto tempo pensavam que a neuropatia periférica induzida por Taxol® demorava a melhorar e/ou resolver: 25% reportaram "7-12 meses" e outros 23% reportaram "nunca resolvida"; para o Taxotere®, as respectivas percentagens foram 29% e 7%. Estes dados são consistentes com as declarações nas bulas do Taxotere® e do Taxol®.

A análise dos dados de Fase II demonstra que o Abraxane® é activo nesta população de indivíduos com pobre prognóstico (87% com doença visceral (pulmão e fígado), 69% com >3 locais metastáticos, 88% com crescimento tumoral enquanto tomavam taxanos), de indivíduos refractários ao taxano com cancro da mama metastático. As observações incluíram 44% de controlo da doença em indivíduos refractários ao Taxotere® e 39% de controlo da doença em indivíduos refractários ao Taxol®. Dos indivíduos cuja doença progrediu enquanto tomavam Taxotere® sozinho no cenário metastático (n=27) notou-se uma taxa de resposta de 19% após receberem semanalmente Abraxane®. Dos indivíduos cuja doença progrediu enquanto tomavam Taxol® sozinho no cenário metastático (n=23) notou-se uma taxa de resposta de 13% após receberem semanalmente Abraxane®.

Verificou-se que o Abraxane® é bem tolerado quando administrado semanalmente ao longo de 30 minutos sem profilaxia com esteróides ou G-CSF: neutropenia de Grau 4 = 3% (sem G-CSF); anemia de Grau 4 = 1%; sem reacções graves de hipersensibilidade (apesar da ausência de pré-medicação).

Nesta população de indivíduos fortemente pré-tratados, 75% dos indivíduos foram tratados com a dose elevada completa de 125 mg/m<sup>2</sup> semanal de Abraxane®, sem reduções da dose devido a toxicidades/acontecimentos adversos. Dos indivíduos que desenvolveram neuropatia sensorial de grau 3, 77% foram capazes de reiniciar o Abraxane® numa dose reduzida (75-100 mg/m<sup>2</sup>) e receberam uma média de 12,2 (gama, 1-28) doses adicionais de Abraxane®. Foi notável notar que destes indivíduos que voltaram ao Abraxane®, 80% (8 de 10) foram capazes de reiniciar o fármaco nos 14 dias após melhoria da neuropatia para Grau 1 ou 2. Estes resultados suportam as observações no ensaio pivot de Fase III do Abraxane® a 260 mg/m<sup>2</sup> administrado a cada 3 semanas, em que foi também notada uma rápida melhoria da neuropatia (mediana de 22 dias). Tomados em conjunto, estes dois ensaios clínicos sugerem que quando o paclitaxel é dado sozinho, a neuropatia que ocorre parece ser de curta duração e é facilmente gerível.

O Abraxane® utiliza a via baseada no receptor gp60 nas células endoteliais de microvasos para transportar o complexo albumina-paclitaxel para fora do vaso sanguíneo e para o interstício tumoral, e mostrou-se que o Taxol® não foi transportado por este mecanismo. Adicionalmente, uma proteína de ligação a albumina, SPARC, foi sobre-expressa em tumores da mama e pode desempenhar um papel na acumulação intratumoral aumentada do Abraxane®. O mecanismo proposto sugeriu que, uma vez no interstício tumoral, o complexo albumina-paclitaxel ligar-se-á à SPARC que estava presente na superfície das células tumorais e será rapidamente internalizado pela célula tumoral através de um mecanismo não lisossómico.

Em adição, os tensioactivos/solventes vulgarmente utilizados em formulações de taxano correntes tais como Cremophor®, Tween® 80 e TPGS, inibem fortemente a ligação do paclitaxel a albumina, desse modo limitando o transporte transendotelial. Dados adicionais apresentados mostraram uma eficácia estatisticamente melhorada do Abraxane® relativamente ao Taxotere® no xenoenxerto de carcinoma mamário MX-1 em dose igual.

Em conclusão, 75% dos indivíduos foram tratados com a dose elevada completa sem reduções de dose. Os dados indicam

uma melhoria rápida da neuropatia periférica quando é administrado paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas sozinho, sem o solvente Cremophor®. Dados adicionais proporcionam evidências aumentadas de que o mecanismo de acção pode desempenhar um papel importante na melhoria dos resultados no indivíduo.

**Exemplo 3. O Abraxane® (ABI-007) actua sinergicamente com péptidos pró-apoptóticos antiangiogénicos de direcccionamento (HKP) em xenoenxertos de tumor humano MDA-MB-435 (apenas para referência)**

A actividade antiangiogénica de péptidos pró-apoptóticos sintéticos pequenos compostos por dois domínios funcionais, em que um direcciona para receptores de CD13 (aminopeptidase N) em microvasos tumorais e o outro rompe a membrana mitocondrial após a internalização ter sido previamente reportada. Veja-se *Nat Med.* 1999 Sep; 5(9):1032-8. Verificou-se que um péptido dimérico de segunda geração, CNGRC-GG-d(KLAKLAK)<sub>2</sub>, denominado H KP (do inglês, "Hunter Killer Peptide") possui actividade antitumoral melhorada. Como os agentes antiangiogénicos tais como o Avastin® exibem sinergia em combinação com agentes citotóxicos tais como 5-fluorouracilo, avaliamos a combinação do H KP antiangiogénico com Abraxane® (ABI-007), um paclitaxel-albumina em nanopartículas que é transportado pelo receptor gp60 no endotélio vascular (Desai, SABCS 2003), em xenoenxertos de tumor da mama humanos MDA-MB-435.

**Métodos:** Os xenoenxertos de tumor da mama humano MDA-MB-435 foram estabelecidos com um volume tumoral médio de 100 mm<sup>3</sup>, os ratinhos foram distribuídos aleatoriamente por grupos de 12-13 animais e foram tratados com H KP, Abraxane®, ou H KP e Abraxane®. O H KP foi entregue por via i.v. (250 ug), uma vez por semana, durante 16 semanas. O Abraxane® foi administrado i.v., diariamente durante 5 dias a 10 mg/kg/dia apenas durante a primeira semana de tratamento. A dose de Abraxane® utilizada estava substancialmente abaixo da sua DMT (30 mg/kg/dia, qd x 5) para impedir que o tumor regredisse completamente de modo a que pudesse ser notado o efeito do H KP.

**Resultados:** às dezanove semanas de tratamento, o volume tumoral foi significativamente diminuído entre o grupo de

controlo ( $10,298 \text{ mm}^3 \pm 2,570$ ) e do HKP ( $4,372 \text{ mm}^3 \pm 2,470$ ;  $p < 0,05$  vs controlo) ou do ABI-007 ( $3,909 \text{ mm}^3 \pm 506$ ;  $p < 0,01$  vs controlo). A combinação de ABI-007 e HKP reduziu significativamente o volume tumoral relativamente a cada monoterapia ( $411 \text{ mm}^3 \pm 386$ ;  $p < 0,01$  vs. monoterapia de Abraxane® ou monoterapia de HKP). Os tratamentos foram bem tolerados.

**Conclusão:** A combinação de Abraxane® (ABI-007), um paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas, com o péptido dimérico antiangiogénico de direccionamento vascular HKP (CNGRC-GG-d(KLAKLAK)<sub>2</sub>), contra o xenoenxerto de tumor da mama MDA-MB-435 apresentou uma redução significativa no volume tumoral comparativamente com a monoterapia com cada um dos agentes isoladamente. Os nossos resultados sugerem que a combinação de Abraxane® com agentes antiangiogénicos, tais como HKP ou talvez Avastin®, pode ser benéfica.

**Exemplo 4. Terapia Metronómica com ABI-007: Actividade Antiangiogénica e Antitumoral de um Paclitaxel ligado a Albumina em Nanopartículas (apenas para referência)**

**Exemplo 4a**

**Métodos:** a actividade antiangiogénica de ABI-007 foi avaliada por ensaios do anel aórtico do rato, da proliferação de células endoteliais da veia umbilical humanas (HUVEC) e da formação de tubos. A dose óptima de ABI-007 para terapia metronómica foi determinada por medição dos níveis de progenitores endoteliais circulantes (CEP) em sangue periférico de ratinhos Balb/c não portadores de tumores ( $n=5/\text{grupo}$ ; dosagem: 1-30 mg/kg, i.p., qd x 7) com citometria de fluxo (Shaked et al., *Cancer Cell*, 7:101-111 (2005)). Subsequentemente, avaliaram-se os efeitos antitumorais de ABI-007 e Taxol® metronómicos (qd; i.p.) e na DMT (qd x 5, 1 ciclo; i.v.) e compararam-se em ratinhos SCID portadores de xenoenxertos de cancro humano da mama MDA-MD-231 e da próstata PC3.

**Resultados:** O ABI-007 a 5 nM inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a excrescência de microvasos aórticos de rato, a proliferação de células endoteliais humanas e a formação de tubos em 53%, 24% e 75%, respectivamente. Observou-se, com

base em medições de CEP, que a dose óptima de ABI-007 para terapia metronómica é 6-10 mg/kg. O ABI-007 metronómico (6 mg/kg), mas não o Taxol® (1,3 mg/kg), suprimiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento tumoral em ambos os modelos de xenoenxerto. Nem o ABI-007 nem o Taxol® administrados metronomicamente induziram qualquer perda de peso. Embora o ABI-007 na DMT (30 mg/kg) inibisse o crescimento tumoral mais eficazmente do que o Taxol® na DMT (13 mg/kg), com o primeiro notou-se uma perda de peso significativa. Interessantemente, o efeito antitumoral do ABI-007 metronómico aproximou-se do do Taxol® na DMT.

Conclusão: O ABI-007 exibe potente actividade antiangiogénica e antitumoral quando utilizado num regime metronómico.

#### **Exemplo 4b**

Ensaio do Anel Aórtico de Rato. Placas de cultura de tecidos de doze poços foram revestidas com Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) e deixou-se gelificar durante 30 min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Excisaram-se as aortas torácicas de ratos Sprague-Dawley machos de 8 a 10 semanas de idade, cortaram-se em secções transversais com 1 mm de comprimento, colocaram-se em poços revestidos de Matrigel e cobriram-se com Matrigel adicional. Após a segunda camada de Matrigel ter estabelecido, cobriram-se os anéis com EGM-II e incubou-se durante a noite a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O EGM-II consiste em meio basal de células endoteliais (EBM-II; Cambrex, Walkersville, MD) mais factores de crescimento de células endoteliais proporcionado como EGM-II Bulletkit (Cambrex). O meio de cultura foi subsequentemente trocado para EBM-II suplementado com 2% de FBS, 0,25 µg/ml de anfotericina B e 10 µg/ml de gentamicina. Trataram-se os anéis aórticos com EBM-II contendo o veículo (sol. Salina a 0,9%/albumina), carboxiamidotriazole (CAI; 12 µg/ml) ou ABI-007 (paclitaxel 0,05-10 nM) durante 4 dias e fotografou-se no quinto dia. CAI, um agente antiangiogénico conhecido, foi utilizado numa concentração superior à clinicamente atingível como controlo positivo. As experiências foram repetidas quatro vezes utilizando aortas de quatro ratos diferentes. A área de brotamento angiogénico, reportada em pixéis quadrados, foi quantificada utilizando o Adobe Photoshop 6.0.

Como mostrado na Figura 1A, o ABI-007 inibiu significativamente a excrescência de microvasos aórticos do rato de uma maneira dependente da concentração relativamente ao controlo de veículo, atingindo significância estatística ( $p < 0,05$ ) a 5 nM (53% de inibição) e 10 nM (68% de inibição). A quantidade de albumina presente em cada concentração de ABI-007 sozinho não inibiu a angiogénesse.

Ensaio de Proliferação de Células Endoteliais. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC; Cambrex) foram mantidas em EGM-II a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Semearam-se as HUVEC em placas de 12 poços a uma densidade de 30 000 células/poço e deixou-se fixar durante a noite. O meio de cultura foi depois aspirado, e foi adicionado a cada poço meio de cultura fresco contendo o veículo (sol. Salina a 0,9%/albumina), ou ABI-007 (paclitaxel 0,05-10 nM). Após 48 h, as células foram tripsinizadas e contadas com um contador Coulter Z1 (Coulter Corp., Hialeah, FL). Todas as experiências foram repetidas três vezes.

Como mostrado na Figura 1B, a proliferação de células endoteliais humanas foi significativamente inibida por ABI-007 a 5 nM e 10 nM em 36% e 41%, respectivamente.

Ensaio de formação de tubos de células endoteliais. Câmaras de lâminas de oito poços foram revestidas com Matrigel e deixou-se gelificar a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 min. Foram então semeadas HUVEC a 30 000 células/poço em EGM-II contendo o veículo (sol. Salina a 0,9%/albumina) ou ABI-007 (paclitaxel 0,05-10 nM) e incubou-se a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 h. Após a incubação, lavaram-se as lâminas com PBS, fixaram-se em metanol a 100% durante 10 s, e coraram-se com solução II DiffQuick (Dade Behring Inc., Newark, DE) durante 2 min. Para analisar a formação de tubos, cada poço foi fotografado digitalmente utilizando uma objectiva de 2,5x. Foi estabelecido um nível limiar para mascarar os tubos corados. A área correspondente foi medida como número de pixéis utilizando o software MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA). As experiências foram repetidas três vezes.

Como mostrado na Figura 1C, o ABI-007 bloqueou a formação de tubos em 75% em ambas as concentrações, 5 nM e 10 nM.

Determinação da Dose Biológica Óptima *In Vivo* de ABI-007 por Medição das Células Endoteliais Circulantes (CEC) e dos Progenitores Endoteliais Circulantes (CEP). Dividiram-se aleatoriamente ratinhos Balb/cJ fêmeas de seis a oito semanas de idade pelos seguintes oito grupos ( $n=5$  cada): não tratados, tratados com injecções i.p. de bolus de cada um de veículo do fármaco (sol. Salina a 0,9%/ albumina), ou ABI-007 a 1, 3, 6, 10, 15 ou 30 mg/kg de paclitaxel diariamente durante 7 dias. No final do período de tratamento, colheram-se amostras de sangue por punctura cardíaca e colheram-se em tubos Vacutainer contendo EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). As CEC e os CEP foram contados utilizando citometria de fluxo de quatro cores. Utilizaram-se anticorpos monoclonais específicos para CD45 para excluir células hematopoiéticas CD45+. As CEC e o seu subconjunto de CEP foram representados utilizando os marcadores endoteliais de murino quinase 1 de fígado fetal/receptor 2 de VEGF (flk-1/VEGFR2), CD13 e CD117 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Realizou-se uma coloração nuclear (Procount; BD Biosciences, San Jose, CA) para excluir a possibilidade das plaquetas ou detritos celulares interferirem com a precisão da contagem de CEC e CEP. Após lise dos glóbulos vermelhos, avaliaram-se suspensões celulares por FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando limites de análise concebidos para excluir células mortas, plaquetas e detritos. Obtiveram-se pelo menos 100 000 eventos/amostra de modo a analisar a percentagem de CEC e CEP. O número absoluto de CEC e CEP foi então calculado como a percentagem dos eventos recolhidos nos limites de contagem de CEC e CEP multiplicados pela contagem total de glóbulos brancos. As percentagens de células coradas foram determinadas e comparadas com os controlos negativos apropriados. A coloração positiva foi definida como sendo superior à coloração não específica de fundo. Utilizou-se 7-aminoactinomicina D (7AAD) para contar as células viáveis *versus* apoptóticas e mortas.

A Figura 2 mostra que o ABI-007 administrado i.p. diariamente durante 7 dias a 3, 10-30 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de CEP em ratinhos Balb/cJ não portadores de tumores. Contudo, o ABI-007 a 10-30 mg/kg foi

associado a uma redução significativa na contagem de glóbulos brancos, indicativa de toxicidade. Embora a redução dos níveis de CEP pelo ABI-007 a 6 mg/kg não atingisse significância estatística, não foi evidente uma diminuição na contagem de glóbulos brancos. Portanto concluiu-se que a dose biológica óptima *in vivo* para o ABI-007 metronómico estava entre 3-10 mg/kg. Num estudo, o Taxol® metronómico a 1,3, 3, 6 ou 13 mg/kg dado *i.p.* diariamente durante 7 dias não reduziu significativamente os níveis de CEP viáveis, enquanto o Taxol® metronómico a 30 mg/kg ou mais resultou em toxicidade grave e eventualmente mortalidade em ratinhos. Foi anteriormente reportado que a administração *i.p.* de Taxol® em doses vulgarmente utilizadas na clínica resultou no aprisionamento de paclitaxel em micelas de Cremophor® EL na cavidade peritoneal e consequentemente, numa concentração plasmática de paclitaxel (Gelderblom *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 8:1237-41 (2002)). Isto explicaria porque doses de Taxol® metronómico (1,3, 3, 6 e 13 mg/kg) que não causaram morte não alteraram os níveis de CEP viáveis. Neste caso, a administração *i.p.* do Taxol® metronómico a 1,3 mg/kg não seria diferente daquela a 13 mg/kg. Portanto a dose menor, 1,3 mg/kg, foi seleccionada para minimizar a quantidade de Cremophor® EL por administração de paclitaxel para experiências subsequentes.

Os efeitos antitumorais do ABI-007 metronómico e na DMT foram comparáveis com os do Taxol® metronómico e na DMT. A linha celular de cancro da próstata humano PC3 e a linha celular de cancro da mama humano MDA-MD-231 foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas, VA). As células PC3 ( $5 \times 10^6$ ) foram injectadas s.c. em ratinhos SCID de 6 a 8 semanas de idade, enquanto as células MDA-MB-231 ( $2 \times 10^6$ ) foram implantadas ortotopicamente na almofada de gordura mamária de ratinhos SCID fêmeas. Quando o volume do tumor principal atingiu aproximadamente 150-200 mm<sup>3</sup>, os animais foram distribuídos aleatoriamente por oito grupos (n=5-10/grupo). Cada grupo foi tratado com controlo de veículo de sol. salina a 0,9%/albumina, controlo de veículo de Cremophor® EL, Taxol® metronómico (1,3 mg/kg, *i.p.*, qd), ABI-007 metronómico (3, 6 ou 10 mg/kg de paclitaxel, *i.p.*, qd), Taxol® na DMT (13 mg/kg, *i.p.*, qd x 5, 1 ciclo), ou ABI-007 na DMT (30 mg/kg de paclitaxel, *i.v.*, qd x 5, 1 ciclo). Mediram-se os diâmetros perpendiculares dos tumores

com um calibrador uma vez por semana e calcularam-se os seus volumes. No final do período de tratamento, colheram-se amostras de sangue por punctura cardíaca de ratinhos em todos os grupos. Contaram-se as CEC e os CEP como aqui descrito.

O ABI-007 metronómico (3, 6 e 10 mg/kg), mas não o Taxol® (1,3 mg/kg), administrado i.p. diariamente durante 4 semanas, inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento de ambos os tumores, MDA-MB-231 e PC3 (Fig. 3A e Fig. 3B). Nem o ABI-007 nem o Taxol® administrados metronomicamente induziram qualquer perda de peso (Fig. 3C e Fig. 3D). Embora o ABI-007 na MTD (30 mg/kg) inibisse o crescimento tumoral mais eficazmente do que o Taxol® na DMT (13 mg/kg), com o primeiro foi notada perda de peso significativa, indicando toxicidade. Em adição, dois de cinco ratinhos tratados com DMT ABI-007 apresentaram sinais de paralisia em um membro 6 dias após a última dose de fármaco. A paralisia foi transitória e resolvida em 24-48 horas. Interessantemente, o efeito antitumoral do ABI-007 metronómico a 6 mg/kg aproximou-se daquele do Taxol® na DMT no modelo de xenoenxerto de MDA-MB-231 (Fig. 3A). O aumento da dose de ABI-007 metronómico para 10 mg/kg não pareceu conferir uma inibição mais pronunciada do crescimento tumoral. Em contraste, o ABI-007 metronómico eliciou maior resposta antitumoral a 10 mg/kg do que a 3 e 6 mg/kg nos xenoenxertos de PC3 (Fig. 3B).

O ABI-007 metronómico aumentou significativamente os níveis de CEP viáveis de uma maneira dependente da dose em ratinhos portadores de tumores MDA-MB-231 (Fig. 4A). Os níveis de CEP viáveis também exibiram uma redução dependente da dose na resposta a ABI-007 metronómico em ratinhos portadores de tumores PC3, mas atingiu significância estatística apenas a 10 mg/kg (Fig. 4B). Os níveis de CEP não foram alterados pelo Taxol® metronómico em nenhum dos modelos de xenoenxerto (Fig. 4A e 4B).

Estudaram-se os efeitos do ABI-007 metronómico e na DMT e do Taxol® metronómico e na DMT sobre a densidade de microvasos intratumoriais. Secções de cinco  $\mu\text{m}$  de espessura obtidas a partir de tumores MDA-MB-231 e PC3 congelados foram coradas com H&E para exame histológico por métodos padrão conhecidos dos peritos na especialidade. Para a detecção de microvasos, coraram-se secções com um anticorpo CD31/PECAM-1 de rato anti-

ratinho (1:1000, BD Pharmingen) seguido por um anticorpo secundário de cabra anti-rato conjugado com vermelho do Texas (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Um único microvaso foi definido como um agrupamento discreto ou única célula corados positivos para CD31/PECAM-1d, e não foi necessária a presença de um lúmen para a classificação como microvaso. A DMV para cada tumor foi expressa como a contagem media dos três campos mais densamente corados identificados com uma objectiva de 20x num sistema de imagiologia de fluorescência Zeiss AxioVision 3.0. Foram analisados quatro a cinco tumores diferentes por cada controlo de veículo ou grupo de tratamento.

Em tumores MDA-MB-231, o ABI-007 metronómico a 6 e 10 mg/kg assim como o ABI-007 na DMT pareceram reduzir a densidade de microvasos (DMV) ligeiramente embora não fosse atingida significância estatística (Fig. 5A). Em tumores PC3, o ABI-007 metronómico a 3 e 10 mg/kg pareceu diminuir a DMV mas sem atingir significância estatística (Fig. 5A). Interessantemente, existiu uma correlação significativa entre a DMV e o nível de CEP viáveis no modelo de MDA-MB-231 (Fig. 5B;  $r=0,76$ ,  $P=0,04$ ) mas não no de PC3 (Fig. 5C;  $r=-0,071$ ,  $P=0,88$ ).

Realizou-se a avaliação da angiogénesis *in vivo*. Realizou-se um ensaio de perfusão num rolhão de Matrigel com modificações mínimas de métodos conhecidos dos peritos na especialidade. Resumidamente, injectaram-se s.c. 0,5 ml de Matrigel suplementado com 500 ng/ml de factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) no dia 0 nos flancos de ratinhos Balb/cJ fêmeas de 10 semanas de idade. No dia 3, os animais foram aleatoriamente atribuídos a oito grupos ( $n = 5$  cada). Cada grupo foi tratado com controlo de veículo de sol. salina a 0,9%/albumina, controlo de veículo de Cremophor® EL, Taxol® metronómico (1,3 mg/kg, i.p., qd), ABI-007 metronómico (3, 6 ou 10 mg/kg de paclitaxel, i.p., qd), Taxol® na DMT (13 mg/kg, i.v., qd x 5), ou ABI-007 na DMT (30 mg/kg de paclitaxel, i.v., qd x 5). Como controlo negativo, injectaram-se cinco ratinhos Balb/cJ fêmeas adicionais de idade similar com Matrigel sozinho. No dia 10, todos os animais foram injectados i.v. com 0,2 ml de FITC-dextrano a 25 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO). Foram subsequentemente colhidas amostras de plasma. Os rolhões de

matrigel foram removidos, incubados com Dispase (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) durante a noite a 37°C, e depois foram homogeneizados. Obtiveram-se as leituras de fluorescência utilizando um leitor de fluorescência de placas FL600 (Biotech Instruments, Winooski, VT). A resposta angiogénica foi expressa como a razão entre a fluorescência do rolhão de Matrigel e a fluorescência do plasma.

O ABI-007 metronómico a 6 e 10 mg/kg pareceu diminuir a angiogénesa embora a inibição não atingisse significância estatística (Fig. 6). A angiogénese pareceu não ser alterada pelo ABI-007 metronómico a 3 mg/kg, pelo ABI-007 na DMT, e pelo Taxol® na DMT e metronómico relativamente aos respectivos controlos de veículo (Fig. 6). Estas observações foram similares aos resultados de DMV intratumoral aqui descritos.

**Exemplo 5. Nab-5109, um IDN5109 Ligado a Albumina em Nanopartículas (nab-5109) Mostra Eficácia Melhorada e Menor Toxicidade Relativamente à Formulação em Tween® (Tween®-5109, Ortataxel) (apenas para referência)**

Métodos: O nab-5109 em nanopartículas foi preparado utilizando tecnologia *nab* e foi caracterizado por dispersão de luz laser. O Nab-5109 e o Tween-5109 foram testados contra xenoenxerto de carcinoma do cólon humano Pgpt DLD-1 (que se sabe ser resistente a paclitaxel e docetaxel - Vredenburg *et al.*, *JNCI* 93: 1234-1245, 2001) em ratinhos nus (n=5/grupo) em doses de 50 mg/kg (Tween®-5109, previamente demonstrada como a DMT) e 75 mg/kg (nab-5109) dados q3d x 4, i.v. Grupos de controlo de PBS e albumina sérica humana (HSA) foram também utilizados.

Resultados: O Nab-5109 originou nanopartículas com tamanho médio de  $Z_{med}=119$  nm e potencial Zeta = -32,7 mV. O Nab-5109 foi liofilizado num pó seco que facilmente se dispersava em sol. salina. *In vivo*, houve significativamente mais perda de peso (ANOVA, p<0,001) nos animais portadores de tumores com o Tween®-5109 (50 mg/kg, perda de 8,8% de peso) do que com o nab-5109 (75 mg/kg, perda de 3,4% de peso) indicando uma toxicidade substancialmente menor do nab-5109 apesar da dose 50% maior. Houve uma supressão tumoral significativa pelo nab-5109 e pelo Tween®-5109 (ANOVA, p<0,0001 vs. controlos) com retardações no crescimento tumoral de 36 e 28 dias

respectivamente para o nab-5109 (75 mg/kg) e para o Tween®-5109 (50 mg/kg). O Nab-5109 foi mais eficaz do que o Tween®-5109 (ANOVA,  $p=0,0001$ ) na supressão do crescimento tumoral. Não houve diferenças entre os grupos de controlo de PBS e de HSA em termos de toxicidade e de eficácia.

**Conclusão:** O nab-5109 ligado a albumina em nanopartículas foi preparado com sucesso e pôde ser dado numa dose 50% maior do que o Tween®-5109 com menor toxicidade apesar da maior dose. Com esta dose maior, 75 mg/kg (q3d x 4), o nab-5109 demonstrou uma eficácia significativamente melhorada no xenoenxerto de cólon humano Pgp+ DLD-1 comparativamente com o Tween®-5109.

**Exemplo 6. Tiocolchicinas Diméricas Ligadas a Albumina em Nanopartículas (nab) nab-5404, nab-5800 e nab-5801: Uma Avaliação Comparativa de Actividade Antitumoral vs Abraxane® e Irinotecano (apenas para referência)**

**Métodos:** As colchicinas em nanopartículas foram preparadas utilizando tecnologia nab. A citotoxicidade foi avaliada *in vitro* utilizando culturas de carcinoma da mama MX-1 humano. A actividade antitumoral *in vivo* (xenoenxerto de tumor do cólon HT29 humano) em ratinhos nus foi comparada contra Irinotecano e Abraxane®. Os níveis das doses para as nab-colchicinas e para o Irinotecano foram de 20 mg/kg, 30 mg/kg e 40 mg/kg, dados q3d x 4, i.v. O Abraxane® foi doseado na sua DMT, 30 mg/kg, dados qd x 5.

**Resultados:** Os dímeros de tiocolchicina hidrófobos originaram nanopartículas com tamanho médio  $Z_{med}$  (nm) de 119, 93 e 84 para o nab-5404, o nab-5800 e o nab-5801, respectivamente. As suspensões de nanopartículas foram esterilizadas através de filtros de 0,22 µm e liofilizadas. *In vitro*, o nab-5404 foi o mais potente dos três análogos contra MX-1 ( $p \leq 0,0005$ , ANOVA), ( $IC_{50}$ (ug/ml): 18, 36 e 77 para o nab-5404, o nab-5800 e o nab-5801, respectivamente) assim como contra o xenoenxerto de HT29 *in vivo* ( $p \leq 0,0001$ , ANOVA). O volume tumoral foi suprimido em 93%, 79% e 48% com o nab-5404 em doses de 40 mg/kg, 30 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. Em contraste, o volume tumoral foi apenas suprimido em 31%, 16% e 21% com o nab-5800; e 17%, 30% e 23% com o nab-5801 a 40 mg/kg, 30 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. O nab-5404 foi

mais eficaz do que o Irinotecano em todos os níveis de doses ( $p \leq 0,008$ , ANOVA) com os volumes tumorais para o Irinotecano suprimidos em apenas 48%, 34% e 29% nos níveis de dose de 40 mg/kg, 30 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. Em comparação com o Abraxane®, o nab-5404 foi mais activo na dose equitóxica (ETD) com base em igual perda de peso ( $p < 0,0001$ , ANOVA). O volume tumoral foi suprimido 93% pelo nab-5404 (40 mg/kg, q4d x 3) e 80% pelo Abraxane® (30 mg/kg, qd x 5) nas suas respectivas ETD.

**Conclusões:** A tecnologia *nab* foi utilizada para converter 3 tiocolchicinas diméricas hidrófobas (IDN5404, IDN5800, IDN5801) em nanopartículas adequadas para administração I.V. O nab-5404 teve superior actividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* comparativamente com o nab-5800 e o nab-5801. O nab-5404 foi mais potente do que o Irinotecano em dose igual. Na dose equitóxica, definida em perda de peso, o nab-5404 foi mais potente do que o Abraxane®. Estes dados garantem a investigação adicional do nab-5404.

**Exemplo 7. Abraxane® vs Taxotere®: Uma Comparação Pré-clínica da Toxicidade e da Eficácia (apenas para referência)**

**Métodos:** A toxicidade do Abraxane® e do Taxotere® foi comparada num estudo de variação da dose em ratinhos nus dando os fármacos num programa q4d x 3. Os níveis das doses foram Taxotere® 7, 15, 22, 33 e 50 mg/kg e ABX 15, 30, 60, 120 e 240 mg/kg. A actividade antitumoral do Abraxane® e do Taxotere® foi comparada em ratinhos nus com xenoenxertos mamários de MX-1 humano numa dose de 15 mg/kg semanal durante 3 semanas.

**Resultados:** Num estudo de escalação da dose em ratinhos, a dose máxima tolerada (DMT) de Taxotere® foi de 15 mg/kg e a dose letal ( $LD_{100}$ ) foi de 50 mg/kg. Em contraste, a DMT de Abraxane® estava entre 120 e 240 mg/kg e a  $LD_{100}$  foi de 240 mg/kg. No estudo do tumor o Abraxane® foi mais eficaz do que doses iguais de Taxotere® na inibição do crescimento tumoral (79,8% vs 29,1%,  $p < 0,0001$ , ANOVA).

**Conclusão:** O paclitaxel ligado a vem nanopartículas (Abraxane®) foi superior ao Taxotere® no modelo de tumor MX-1 quando testado em doses iguais. Adicionalmente, a toxicidade

do Abraxane® foi significativamente inferior à do Taxotere®, o que permitirá uma dosagem de Abraxane® a níveis substancialmente superiores. Estes resultados são similares ao índice terapêutico melhorado observado com o Abraxane® comparativamente com o Taxol® e sugere que a presença de tensioactivos pode prejudicar o transporte, a actividade antitumoral e aumentar a toxicidade dos taxanos. Estão a decorrer estudos em modelos tumorais adicionais que comparam o Abraxane® e o Taxotere®.

**Exemplo 8. Um Dímero de Tiocolchicina Ligado a Albumina em Nanopartículas (nab-5404) com Mecanismos de Acção Duplos sobre a Tubulina e a Topoisomerase-1: Avaliação da Actividade *In vitro* e *In vivo* (apenas para referência)**

Métodos: Testou-se o IDN5404 quanto a actividade citotóxica utilizando o carcinoma da mama MCF7-S e a sua variante resistente a múltiplos fármacos, MCF7-R (pgp+). A sua citotoxicidade foi também avaliada contra o painel de linhas celulares tumorais humanas NCI-60. O nab-5404 ligado a albumina em nanopartículas foi administrado IV utilizando vários programas, a ratinhos SCID implantados s.c. com um xenoenxerto de tumor ovariano A121 humano.

Resultados: Contra linhas celulares MCF7, o composto progenitor, colchicina, demonstrou inibição do crescimento tumoral com o valor de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória do crescimento em 50%) para células MCF7-S de  $3,9 \pm 0,2$  nM. A variante resistente MCF7-R demonstrou uma IC<sub>50</sub> de  $66 \pm 8,6$  nM, um aumento de aproximadamente 17 vezes devido à resistência ao fármaco. O IDN5404 demonstrou actividade aumentada contra ambas as linhas celulares, exibindo valores de IC<sub>50</sub> de  $1,7 \pm 0,1$  e  $40 \pm 3,8$  nM, respectivamente. Estes resultados foram confirmados no painel de linhas celulares tumorais humanas NCI60 com IDN5404 possuindo uma IC<sub>50</sub> média  $<10^{-8}$ M e resistência  $> 10$  vezes entre as linhas celulares MCF7-S e MCF7-R. O algoritmo COMPARE identificou o IDN5404 como um aglutinante de tubulina similar aos alcalóides de vinca, confirmando os resultados prévios. *In vivo*, contra o xenoenxerto de tumor ovariano A121, a eficácia e a toxicidade do nab-5404 foi dependente da dose e do programa. O nab-5404 em nanopartículas foi bem tolerado e capaz de induzir regressões completas e curas: a 24 mg/kg administrado IV qd x

5, 5 de 5 ratinhos foram sobreviventes de longo prazo (SLP) sem evidência de tumor. Contudo, aumentando a dosagem para 30 mg/kg resultou em 5 de 5 mortes tóxicas. Num programa de q3d x 4, 30 mg/kg resultaram em 4 de 5 ratinhos SLP e a 50 mg/kg, 5 de 5 mortes tóxicas. Utilizando um programa q7d x 3, 40 mg/kg resultaram em 3 de 5 ratinhos SLP e a 50 mg/kg, notaram-se 4 de 4 SLP.

**Conclusões:** O IDN5404, um novo dímero de tiocolchicina com mecanismo de acção duplo apresentou actividade em linhas celulares que expressam pgp, resistentes a cisplatina e a topotecano. *In vivo*, o nab-5404 ligado a albumina em nanopartículas foi activo contra xenoenxertos de A121 ovariano.

**Exemplo 9. Estudos de Combinação de Abraxane® e Outros Agentes (apenas para referência)**

Devido às propriedades vantajosas do Abraxane® (ABX, o paclitaxel ligado a albumina em nanopartículas) notadas acima, este foi utilizado e sendo utilizado em vários estudos com diferentes modos de administração e programas e em combinação com outros fármacos oncológicos assim como tratamento com radiação. Estes estão listados adiante:

No cancro da mama metastático, estes estudos incluem:

Ensaio de Fase II Randomizado de Abraxane® Semanal em Combinação com Gemcitabina em Indivíduos com Cancro da Mama Metastático Negativo para HER2	ABX 125, Gem 1000 mg/m <sup>2</sup> , D1,8; q3wk	para avaliar a combinação de ABX e Gemcitabina em CMM em 1. <sup>a</sup> linha.
Um estudo de fase II de dose-densa semanal de paclitaxel em nanopartículas (ABI-007) carboplatina, com Herceptin® como terapia de primeira ou segunda linha de cancro da mama positivo para HER2 avanhado	ABX 100 mg/m <sup>2</sup> , Carbo AUC 2, ambos D1,8,15; Her 2 mg/kg (4 mg/kg na sem a) q4wk x 6	Os dados serão importantes para utilização de ABX em combinação com carbo e/ou Herceptin®. Também útil para outras combinações.

Vinorelbina e Abraxane® Semanais, com ou sem G-CSF, em cancro da mama de estádio IV: um estudo de fase I-II	L1: ABX 80, Nav 15; L2: ABX 90, Nav 20; L3: ABX 100, Nav 22.5; L4: ABX 110, Nav 25; L5: ABX 125, Nav 25 qwk	Estudo multicentrado de ABX em combinação com Navelbine® em CMM em primeira linha.
Ensaio de fase II de monoterapia com Abraxane® semanal para CMM em 1.ª linha (mais Herceptin® em pacientes Her2+)	ABX 125 mg/m <sup>2</sup> Q3/4wk	Um estudo de fase II relativamente grande de monoterapia com ABX semanal a 125 mg/m <sup>2</sup> em CMM em 1.ª linha.
Ensaio de fase I/II de Abraxane® mais Doxil® para CMM mais limitado pela PK	ABX + Antraciclina	
Ensaio de fase II de 3 braços em CMM em 1.ª linha	ABX semanal (130 mg/m <sup>2</sup> ) vs. q2wk (260 mg/m <sup>2</sup> ) vs. q3wk (260 mg/m <sup>2</sup> )	Para optimizar o regime de monoterapia com ABX para CMM
ensaio de fase II de 3 braços em CMM, 1.ª linha e 2.ª linha, com análise de correlativos biológicos	ABX semanal vs. ABX q3wk vs. Taxol® semanal	ensaio randomizado de ABX para CMM para obter dados importantes: ABX semanal vs. Taxol® semanal; ABX semanal vs. ABX 3-semanal; mais estudo de biomarcador (caveolina-1 e SPARC).
Fase I/II de Abraxane® + GW572016	TBD	combinação de ABX e GW572016 (um inibidor duplo de EGFR e um dos mais promissores novos agentes biológicos para CM) .
Um estudo de fase I de escalação da dose de um pulso de quimiossensibilização a gefitinib oral de 2 dias dado antes de Abraxane® semanal em indivíduos com tumores sólidos avançados	Abraxane® 100 mg/m <sup>2</sup> semanal, 3 de 4 semanas; Gefitinib partindo de 1000 mg/d x 2 dias	Este ensaio de fase I é para determinar a segurança e a tolerabilidade de um pulso de gefitinib de 2 dias dado antes da administração de Abraxane®.
Fase II, ensaio de CMM, 1.ª linha	ABX semanal (125 mg/m <sup>2</sup> , 2 sem sim e 1 sem não) + Xeloda® 825 mg/m <sup>2</sup> d 1-14 q3wk	Para avaliar a combinação de ABX e Xeloda® em CMM em 1.ª linha, utilizando um regime de 2 semanas sim e 1 semana não de ABX.
Ensaio piloto adjuvante de fase II de Abraxane® em cancro da mama	Dose densa de AC + G CSF --> ABX semanal --> Avastin®	Um estudo piloto adjuvante de uma "dose super-densa"

Abraxane® em quimioterapia adjuvante de dose-densa para cancro da mama em estádio inicial	AC q2wk x 4 + G CSF --> ABX q2wk x 4	Um estudo piloto adjuvante de regime de dose densa de ABX - uma alternativa a um regime adjuvante padrão
Ensaio piloto adjuvante de fase II de Abraxane® em cancro da mama	AC Q2wk --> ABX q2wk + G-CSF	Um estudo piloto adjuvante na preparação para o ensaio adjuvante de fase III

Estudos de cancro da mama no cenário de neo-adjuvante incluem:

Ensaio de fase II Trial de Gemcitabina Neo-adjuvante de Dose Densa, Epirubicina, ABI-007 (GEA) em Cancro da mama localmente avançado ou Inflamatório	Neo-adjuvante: Gem 2000, Epi 60, ABX 175 mg/m <sup>2</sup> , Neul 6 mg SC, todos D q2wk x 6 Adjuvante: Gem 2000, ABX 220, Neul 6 mg D1 q2wk x 4	Este estudo neo-adjuvante é baseado nos dados de GET da Europa que mostraram actividade elevada. No regime corrente, o ABX irá substituir T, ou Taxol®.
Ensaio de fase II pré-operatório de Abraxane® seguido por FEC (+ Herceptin® conforme apropriado) no cancro da mama	ABX 220 mg/m <sup>2</sup> q2wk x 6 seguido por FEC x 4 (+Herceptin® para pacientes Her2+)	
Estudo pré-clínico de interacção fármaco-fármaco	ABX + outros agentes	
Fase II, neo-adjuvante	(ABX + Herceptin®) seguidos por (Navelbine®+ Herceptin®)	
Ensaio de Fase II Randomizado de quimioterapia neo-adjuvante em indivíduos com cancro da mama	TAC vs. AC seguidos por ABX + carbo vs. AC seguido por ABX + carbo + Herceptin®	Para avaliar o AC seguido por combinações ABX/carbo ou ABX/carbo/Herceptin® vs TAC (um regime adjuvante aprovado pela FDA para CM) no cenário de neo-adjuvante.
Ensaio de fase II neo-adjuvante de Abraxane® e capecitabina em cancro da mama localmente avançado	ABX: 200 mg/m <sup>2</sup> D1; Xel: 1000 mg/m <sup>2</sup> D1-14; q3wk x 4	

Ensaio de fase II de quimioterapia neo-adjuvante (NCT) com paclitaxel em nanopartículas (ABI-007, Abraxane®) em mulheres com cancros da mama de estádio clínico IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV (com primário intacto)	ABX: 300 mg/m <sup>2</sup> q3wk	
--	---------------------------------	--

No cancro do pulmão os estudos incluem:

Estudo de fase I/II de monoterapia de Abraxane® em CPCNP avançado em 1.ª linha	ABX semanal	O primeiro ensaio de fase II de ABX comb com carbo em CPCNP.
Ensaio de fase II de Abraxane® semanal mais carboplatina em CPCNP em 1.ª linha	ABX: 125 mg/m <sup>2</sup> D1,8,15; Carbo: AUC 6D1; q4wk	
Um ensaio de fase I de Carboplatina e Abraxane® num programa semanal e de três em três semanas em indivíduos com malignidades de tumor sólido avançado	Braço 1: ABX 100, 125, 150 mg/m <sup>2</sup> D1,8,15 q4wk; Braço 2: ABX 220, 260, 300 mg/m <sup>2</sup> D1 q3wk. Carbo AUC6 em ambos os braços	Este estudo de fase I de 2 braços irá gerar importantes dados sobre a combinação ABX/carbo para estudos adicionais desta comb. em múltiplas doenças.
Estudo de fase II de ABI 007 (Abraxane®) e carboplatina em cancro do pulmão de células não pequenas avançado.	ABX Nível(a): 225 mg/m <sup>2</sup> ; Nível(b): 260 mg/m <sup>2</sup> ; Nível(3): 300 mg/m <sup>2</sup> ; q3wk Carbo fixada a AUC6 q3wk	Este estudo de fase II de CPCNP irá gerar dados para um futuro ensaio para registo de fase III no cancro do pulmão
Estudo de fase I de ABI 007 (Abraxane®) e carboplatina	ABX q3wk	
Estudo de fase I/II de Abraxane® + Alimta® para CPCNP em 2.ª linha	TBD	O ABX e o Alimta® podem ser uma combinação promissora devido aos perfis de toxicidade não sobrepostos.
Ensaio de fase I/II de Abraxane® mais cisplatina em CPCNP avançado		

Estudo de fase I/II de Abraxane®, Navelbine®, e Cisplatina para tratamento de CPCNP avançado		
fase II, mono de ABX em CPCNP em 1. <sup>a</sup> linha	ABX 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk	O 1. <sup>o</sup> ensaio de ABX em CPCNP.
Estudo de fase II de monoterapia de Abraxane® em CPCNP em 2. <sup>a</sup> linha	Coorte 1: ABX q3wk; Coorte 2: ABX semanal. Doses TBD	
Ensaio de fase I/II de Abraxane® semanal e carboplatina em CPCNP avançado	1. <sup>a</sup> linha	

Os estudos na Próstata incluem:

Fase II, randomizado, de ABX semanal vs Q3W em CPRH, primeira linha	100 mg/m <sup>2</sup> semanal vs 260 mg/m <sup>2</sup> q3wk	
Fase II de ABX em cancro da próstata, 1. <sup>a</sup> linha	ABX semanalmente	Estudo de fase II de ABX semanal em CPRH, 1. <sup>a</sup> linha
estudo de fase II neo-adjuvante	TBD	Um ensaio neo-adjuvante multicentrado de ABX em cancro da próstata mais estudo de biomarcador.
Fase II de ABX 100 mg semanal sem folgas		

Os estudos no cancro ovariano incluem:

Estudo de fase II de Abraxane® para tratamento de cancro ovariano avançado (3. <sup>a</sup> linha)	TBD	
Estudo de fase I de Abraxane® mais carbo para tratamento de cancro ovariano avançado	ABX semanal + Carbo AUC 6	
Um ensaio de fase II de Abraxane®/Carboplatina em cancro ovariano recorrente		

Os estudos na quimiorradiação incluem:

Ensaio de fase I/II de Abraxane® combinado com radiação em CPCNP		
Abraxane® Combinado Com Radiação	modelo animal	
H&N (Cancro da cabeça e pescoço)	TBD	

Outros estudos incluem:

Estudo de fase II de ABX no tratamento de carcinoma do cérvix persistente ou recorrente	125 mg/m <sup>2</sup> d1, 8, 15 q28 dias	
Fase II em melanoma metastático previamente tratado (100 ABX) e não tratado (150 ABX)	26-->70	
Fase II, tratamento com utilização única de ABI-007 para o tratamento de malignidades não hematológicas		
Abraxane® combinado com agentes antiangiogénicos, e.g., Avastin®.		
Abraxane® combinado com inibidores de proteassomas e.g., Velcade®.		
Abraxane® combinado com inibidores de EGFR e.g., Tarceva®.		
Um ensaio de fase II randomizado de gemcitabina semanal, Abraxane®, e irradiação externa para cancro pancreático localmente avançado		

**Exemplo 10. Combinação de fármacos da invenção em nanopartículas com outros agentes e modos de terapia (apenas para referência)**

A menor toxicidade dos fármacos da invenção em nanopartículas aqui descrita permite a combinação com outros fármacos oncológicos e outros modos de tratamento com resultados mais vantajosos. Estes incluem formas de nanopartículas de paclitaxel, docetaxel, outros taxanos e análogos, geldanamicinas, colchicinas e análogos, combretastatinas e análogos, compostos de pirimidina hidrófobos, lomaiviticinas e análogos incluindo compostos com as estruturas nucleares de lomaiviticina, epotilonas e análogos, discodermolida e análogos, e similares. Os fármacos da invenção podem ser combinados com paclitaxel, docetaxel,

carboplatina, cisplatina, outras platinas, doxorrubicina, epirrubicina, ciclofosfamida, ifosfamida, gemcitabina, capecitabina, vinorelbina, topotecano, Irinotecano, tamoxifeno, camptotecinas, 5-FU, EMP, etoposido, metotrexato e similares.

**Exemplo 11. Combinação de Abraxane® com Carboplatina e Herceptin® (apenas para referência)**

A combinação de Taxol® e carboplatina apresentou eficácia significativa contra o cancro da mama metastático. Num programa semanal, nesta combinação, o Taxol® apenas pode ser doseado até  $80 \text{ mg/m}^2$ . Doses superiores não podem ser toleradas devido à toxicidade. Em adição, indivíduos positivos para HER-2 obtêm maior benefício quando o Herceptin® é incluído no seu regime terapêutico. Este estudo de fase II sem ocultação foi conduzido para determinar o efeito terapêutico sinérgico de ABI-007 (Abraxane®) com estes agentes. O presente estudo foi iniciado para avaliar a segurança e a actividade antitumoral de ABI-007/carboplatina com Herceptin® para indivíduos com doença positiva para HER-2. O ABI-007 foi dado em combinação com carboplatina e Herceptin® administrados semanalmente por via intravenosa a indivíduos com cancro da mama positivo para HER-2 avançado. Uma coorte de 3 indivíduos recebeu ABI-007 numa dose de  $75 \text{ mg/m}^2$  IV seguido por carboplatina com objectivo de  $\text{AUC} = 2$  semanalmente e infusão de Herceptin® ( $4 \text{ mg/kg}$  na semana 1, e  $2 \text{ mg/kg}$  em todas as semanas subsequentes) durante 1 ciclo. Estes indivíduos toleraram o fármaco muito bem e por isso em todos os outros ciclos subsequentes e indivíduos a dose de ABI-007 foi escalada para  $100 \text{ mg/m}^2$ . Até à data foram tratados seis indivíduos. Dos 4 indivíduos que foram avaliados quanto à resposta, todos os 4 (100%) apresentaram uma resposta à terapia. Deve notar-se que devido à menor toxicidade do Abraxane®, pode ser dada uma dose de paclitaxel total superior em comparação com o Taxol® com benefícios resultantes para os indivíduos.

**Exemplo 12. Combinação de Abraxane® com Carboplatina (apenas para referência)**

A combinação de Taxol® e carboplatina apresentou eficácia significativa no cancro do pulmão. Está a decorrer outro

estudo com Abraxane® em combinação com carboplatina num programa de 3-semanal em indivíduos com cancro do pulmão.

**Exemplo 13. Utilização de Abraxane® em Combinação com Radiação (apenas para referência)**

**Exemplos 13a**

O Abraxane®, combinado com radioterapia clínica, melhora a eficácia terapêutica e reduz a toxicidade para tecido normal. O Abraxane® é utilizado para aumentar o ganho terapêutico da radioterapia para tumores; para melhorar a resposta do tumor a irradiação simples e fraccionada; para melhorar a resposta do tecido normal à radiação e para aumentar a razão terapêutica da radioterapia.

Utiliza-se um carcinoma ovariano murino, designado por OCa-I, que foi extensamente investigado. Primeiro, é determinado o horário óptimo de administração de Abraxane® relativamente à radiação local no tumor para produzir a máxima eficácia antitumoral. Os tumores são gerados na perna traseira direita de ratinhos por injecção i.m. de células tumorais e o tratamento é iniciado quando os tumores atingem 8 mm de tamanho. Os ratinhos são tratados com uma dose de irradiação única de 10 Gy, uma dose única de Abraxane® ou com terapia de combinação de Abraxane® dado em momentos diferentes 5 dias antes de 1 dia após irradiação. Utiliza-se uma dose de Abraxane® igual a cerca de 1½ vezes mais do que a dose máxima tolerada de paclitaxel, uma dose de 90 mg/kg. O ponto final de eficácia é a retardação do crescimento tumoral. Os grupos consistem em 8 ratinhos cada. Os tumores são gerados e tratados como descrito no Objectivo 1. O ponto final de eficácia é a retardação do crescimento tumoral. Os tumores são irradiados com 5, 7,5 ou 10 Gy entregues numa única dose ou em doses fraccionadas de 1, 1,5 ou 2 Gy de radiação diária durante cinco dias consecutivos. Como o Abraxane® é retido no tumor durante vários dias e exerce o seu efeito melhorador em cada uma das cinco fracções diárias, o Abraxane® é dado uma vez no início do regime de radiação. Como o objective final na radioterapia clínica é conseguir a cura do tumor, é determinado o potencial do Abraxane® para melhorar a capacidade de cura do tumor por radiação. Utiliza-se o mesmo esquema que se descreveu para o estudo de retardação do

crescimento tumoral fraccionado, excepto que é dada uma gama de doses de 2 a 16 Gy diariamente durante cinco dias consecutivos (dose total de radiação de 10 a 80 Gy). Os tumores são seguidos quanto a regressão e novo crescimento durante até 120 dias após a irradiação, quando é determinada a TCD50 (a dose de radiação necessária para originar cura local do tumor em 50 porcento dos animais). Existem dois ensaios de TCD50: radiação apenas e Abraxane® mais radiação, e cada ensaio consiste em 10 grupos de dose de radiação contendo 15 ratinhos cada. Para proporcionar um ganho terapêutico, qualquer agente melhorador da radiação, incluindo o Abraxane®, tem que aumentar a resposta do tumor à radiação mais do que o aumento de danos no tecido normal pela radiação. São avaliados os danos na mucosa jejunal, um tecido altamente proliferativo afectado pelos taxanos. Utiliza-se o ensaio de microcolónias jejuna para determinar a sobrevivência de células epiteliais da cripta no jejuno de ratinhos expostos a radiação. Os ratinhos são expostos a radiação de corpo inteiro (WBI) com doses diárias de raios-x variando de 3 a 7 Gy durante cinco dias consecutivos. Os ratinhos são tratados com Abraxane®, numa dose equivalente de paclitaxel de 80 mg/kg, administrado i.v. 24 h antes da primeira dose de WBI e são mortos 3,5 dias após a última dose de WBI. O jejuno é preparado para exame histológico, e é contado o número de criptas em regeneração na secção transversal de jejuno. Para construir curvas de sobrevivência à radiação, o número de criptas em regeneração é convertido no número de células sobreviventes.

### **Exemplo 13b**

O objectivo deste estudo foi avaliar se o ABI-007 (a) como único agente possui actividade antitumoral contra o carcinoma ovariano murino OCa-1 singénico e (b) melhora a resposta à radiação de tumores OCa-1 num regime de tratamento combinado como descrito no exemplo anterior com as modificações que se seguem.

Células tumorais OCa-1 foram injectadas i.m. na perna traseira de ratinhos C3H. Quando os tumores cresceram até um diâmetro médio de 7 mm, iniciou-se um único tratamento com radiação local (10 Gy) na perna portadora do tumor, ABI-007 90 mg/kg i.v., ou ambos. Para determinar o programa óptimo de tratamento, o ABI-007 foi dado de 5 dias a 9 horas antes da

radiação assim como 24 horas após radiação. O ponto final do tratamento foi a retardação absoluta do crescimento tumoral (AGD), definido como a diferença em dias para crescer de 7-12 mm de diâmetro entre tumores tratados e não tratados. Para grupos tratados com a combinação de ABI-007 e radiação, calculou-se um factor de melhoria (FM) como a razão entre diferença em dias para crescer de 7 a 12 mm entre os tumores tratados com a combinação e os tratados com ABI-007 apenas, e o AGD de tumores tratados com radiação apenas. Para avaliar o efeito de melhoria da radiação do ABI-007 para um regime de radiação fraccionada no ponto final de cura do tumor, realizou-se um ensaio de TCD50 e analisou-se 140 dias após o tratamento. Administraram-se doses totais de 5 a 80 Gy em 5 fracções diárias, isoladamente ou combinadas com ABI-007 24 horas antes da primeira dose de radiação.

Como agente único, o ABI-007 prolongou significativamente a retardação do crescimento do tumor OCa-1 (37 dias) comparativamente com os 16 dias para tumores não tratados. O ABI-007 como agente único foi mais eficaz do que uma única dose de 10 Gy, que resultou numa retardação de 29 dias. Para os regimes de tratamento combinado, o ABI-007 dado em qualquer momento até 5 dias antes da radiação, produziu um efeito antitumoral supra-aditivo. O FM foi de 1,3, 1,4, 2,4, 2,3, 1,9 e 1,6 com intervalos inter-tratamentos de 9h, 24 h e 2, 3, 4, e 5 dias, respectivamente. Quando o ABI-007 foi dado após a radiação, o efeito do tratamento antitumoral combinado foi menos que aditivo. O tratamento combinado com ABI-007 e radiação também teve um efeito significativo sobre a cura do tumor desviando a TCD50 de 55,3 Gy para tumores tratados com radiação apenas para 43,9 Gy para os que foram tratados com a combinação (FM 1.3).

Esta experiência demonstrou que o ABI-007 possui actividade antitumoral como agente único contra OCa-1 e melhora o efeito da radioterapia quando dado vários dias antes. Como anteriormente demonstrado para o paclitaxel e para o docetaxel, a melhoria da radiação é provavelmente um resultado de múltiplos mecanismos, sendo dominante uma paragem do ciclo celular em G2/M a intervalos de tratamento curtos e reoxigenação do tumor a intervalos mais longos.

**Exemplo 14. Combinação de Abraxane® e Inibidores de Tirosina-quinase (apenas para referência)**

A dosagem por pulsos de gefitinib em combinação com a utilização de Abraxane® é útil para inibir a proliferação de tumores que expressam EGFr. 120 ratinhos nus são inoculados com células tumorais BT474 para obter pelo menos 90 ratinhos portadores de xenoenxerto de tumor BT474 e dividem-se em 18 braços experimentais (5 ratinhos cada). No braço 1 os ratinhos recebem injecções i.v. de controlo. Todos os outros ratinhos recebem semanalmente injecções i.v. de Abraxane® a 50 mg/kg durante 3 semanas. No braço 2 recebem Abraxane® apenas. Nos braços 3, 4, 5, 6, 7, 8 recebem semanalmente Abraxane® precedido por 2 dias de um pulso de gefitinib em doses crescentes. Nos braços 9, 10, 11, 12, 13 recebem semanalmente Abraxane® precedido por um dia de um pulso de gefitinib em doses crescentes. Nos braços 14, 15, 16, 17, 18 recebem semanalmente Abraxane® juntamente com administração diária de gefitinib em doses crescentes. É estabelecida a dose máxima tolerada de gefitinib que pode ser dada num pulso de 1 ou 2 dias precedendo o Abraxane® semanal ou em administração contínua com Abraxane®. Em adição, a medição de respostas antitumorais irá determinar se existe uma relação de dose-resposta e qual é superior, pulsos de 2 dias ou pulso de 1 dia. Estes dados são utilizados para seleccionar a dose óptima de gefitinib por pulsos e a de gefitinib contínuo diário dado com Abraxane®.

120 ratinhos nus são inoculados com células tumorais BT474 para obter 90 ratinhos portadores de tumor. Estes ratinhos são divididos em 6 grupos (15 cada). No braço 1 recebem injecções i.v. de controlo. No braço 2 recebem Abraxane® a 50 mg/kg i.v. semanalmente durante 3 semanas. No braço 3 recebem gefitinib oral a 150 mg/kg/dia. No braço 4 recebem Abraxane® a 50 mg/kg juntamente com gefitinib diário na dose previamente estabelecida. No braço 5 recebem Abraxane® a 50 mg/kg precedido por um pulso de gefitinib na dose e com a duração previamente estabelecidas. No braço 6 recebem apenas um pulso de gefitinib semanal na dose previamente estabelecida. Após três semanas de terapia, os ratinhos são seguidos até os controlos atingiram os tamanhos de tumor máximos permitidos.

**Exemplo 15. Estudo de Fase II de nab<sup>TM</sup>-Paclitaxel (Abraxane<sup>®</sup>) Semanal, de Dose-densa, Carboplatina Com Trastuzumab<sup>®</sup> Como Terapia de Primeira Linha de Cancro da Mama Positivo para HER-2 Avançado (apenas para referência)**

Este estudo tinha como objectivo avaliar (1) a segurança e a tolerabilidade e (2) a taxa de resposta objectiva de trastuzumab/Abraxane<sup>®</sup>/carboplatina semanal em dose densa como terapia citotóxica de primeira linha para pacientes com cancro da mama que sobre-expressa HER-2 avançado/metastático (adenocarcinoma Estadio IV). O trastuzumab é um anticorpo monoclonal, também conhecido por Herceptin<sup>®</sup>, que se liga ao segmento extracelular do receptor erbB2.

Resumidamente, foram incluídos pacientes sem radioterapia ou tratamento citotóxico recentes. As doses de Abraxane<sup>®</sup> foram escaladas de 75 mg/m<sup>2</sup> na forma de infusões i.v. de 30 min nos dias 1, 8, 15, até 100 mg/m<sup>2</sup> durante ciclos subsequentes de acordo com a regra padrão 3 + 3. A carboplatina AUC = 2 foi dada na forma de infusões i.v. de 30-60 min nos dias 1, 8, 15 e durante um ciclo inicial de 29 dias. O trastuzumab foi dado na forma de infusão i.v. de 30-90 min nos dias 1, 8, 15, 22 numa dose de 4 mg/kg na semana 1 e 2 mg/kg em todas as semanas subsequentes.

Para 8 de 9 pacientes avaliáveis para resposta a taxa de resposta (confirmada mais não confirmada) foi 63% com 38% de doença estável. As toxicidades mais comuns foram neutropenia (grau 3: 44%; grau 4: 11%) e leucocitopenia (33%).

Estes resultados sugerem que o trastuzumab mais Abraxane<sup>®</sup> mais carboplatina demonstraram um elevado grau de actividade antitumoral com tolerabilidade aceitável como terapia de primeira linha para CMM.

**Exemplo 16. Ensaio de Fase II de Capecitabina Mais nab<sup>TM</sup>-Paclitaxel (Abraxane<sup>®</sup>) no Tratamento de Primeira Linha de Cancro da Mama Metastático (apenas para referência)**

A finalidade deste estudo de fase II foi avaliar a segurança, a eficácia (tempo até à progressão e sobrevivência global) e a qualidade de vida de pacientes com CMM que receberam capecitabina em combinação com Abraxane<sup>®</sup>. A

capecitabina é um carbamato de fluoropirimidina também conhecido por Xeloda® que mostrou ter eficácia substancial sozinho e em combinação com taxanos no tratamento de CMM.

Neste estudo de braço único e sem ocultação, o Abraxane® a 125 mg/m<sup>2</sup> foi dado por infusão i.v. no dia 1 e no dia 8 a cada 3 semanas mais capecitabina a 825 mg/m<sup>2</sup> dada oralmente duas vezes por dia nos dias 1 a 14 a cada 3 semanas. Os pacientes eram negativas para HER-2/neu com uma esperança de vida superior a 3 meses. Os pacientes não fizeram quimioterapia anterior para doença metastática, nem terapia anterior com capecitabina, nem terapia anterior com fluoropirimidina nem quimioterapia com paclitaxel dada num cenário de adjuvante.

Foram arrolados 12 pacientes com análise de segurança completada nos primeiros 6 pacientes e a taxa de resposta avaliável após 2 ciclos nos primeiros 8 pacientes. Não houve toxicidades únicas ou inesperadas nem toxicidades de grau 4 ou neuropatia superior a grau 1. Os dados de respostas foram confirmados apenas nos primeiros 2 ciclos de terapia (primeiro ponto de avaliação) em 6 pacientes. Dois pacientes completaram 6 ciclos com 1 resposta parcial e 1 doença estável. Dos primeiros 8 pacientes após 2 ciclos, houve 2 respostas parciais e 4 com doença estável.

Estes resultados mostram que a combinação de capecitabina e Abraxane® semanal em doses eficazes é exequível sem novas toxicidades até à data. A toxicidade relacionada com o Abraxane® foi principalmente neutropenia sem consequências clínicas, e a síndrome mão-pé foi a toxicidade principal da capecitabina.

**Exemplo 17. Estudo Piloto de Doxorrubicina em Dose-Densa mais Ciclofosfamida Seguidas por nab-paclitaxel (Abraxane®) em Pacientes com Cancro da Mama em Estágio Inicial (apenas para referência)**

O objectivo deste estudo foi avaliar a toxicidade da doxorrubicina (adriamicina) mais ciclofosfamida seguidas por Abraxane® em cancro da mama em estágio inicial.

Os pacientes tinham adenocarcinoma da mama de um estádio inicial, operável, histologicamente confirmado. Os pacientes receberam doxorrubicina (adriamicina) a  $60 \text{ mg/m}^2$  mais ciclofosfamida a  $600 \text{ mg/m}^2$  (AC) a cada 2 semanas durante 4 ciclos seguidas por Abraxane® a  $260 \text{ mg/m}^2$  de duas em duas semanas durante 4 ciclos.

30 pacientes receberam 4 ciclos de AC, e 27 de 29 pacientes receberam 4 ciclos de Abraxane®; 33% dos pacientes receberam pegfilgrastim (Neulasta®) para falta de recuperação de ANC (contagem absoluta de neutrófilos) durante o Abraxane®. Nove pacientes (31%) tiveram reduções da dose de Abraxane® devido a toxicidade não hematológica. Um total de 9 pacientes tiveram neuropatia periférica (NP) de grau 2 e 4 pacientes de grau 3; A NP melhorou em  $\geq 1$  grau dentro da mediana de 28 dias.

Estes resultados indicam que a terapia de dose densa com doxorrubicina ( $60 \text{ mg/m}^2$ ) mais ciclofosfamida ( $600 \text{ mg/m}^2$ ) a cada 2 semanas durante 4 ciclos seguidas por dose densa de Abraxane® ( $260 \text{ mg/m}^2$ ) a cada 2 semanas durante 4 ciclos foi bem tolerada em pacientes com cancro da mama de estádio inicial.

**Exemplo 18. nab-Paclitaxel (Abraxane®) Semanal como Tratamento de Primeira Linha de Cancro da Mama Metastático com Trastuzumab Adicionado para Pacientes Positivos para HER-2/neu (apenas para referência)**

A finalidade do presente estudo foi transportar o Abraxane® semanal para um cenário de primeira linha e adicionar trastuzumab para pacientes positivos para HER2/neu.

Este estudo de fase II, sem ocultação, incluiu 20 pacientes positivos para HER2 e 50 negativos para HER2 com cancro da mama localmente avançado ou metastático. O Abraxane® foi dado a  $125 \text{ mg/m}^2$  por infusão i.v. de 30 minutos nos dias 1, 8 e 15 seguido por uma semana de folga. O trastuzumab foi dado concorrentemente com o tratamento em estudo para pacientes que eram positivos para HER2. O ponto final principal foi a taxa de resposta e os pontos finais secundários foram o tempo até à progressão (TTP), a sobrevivência global (OS) e a toxicidade.

Na população de segurança, 23 pacientes receberam uma mediana de 3 ciclos de Abraxane® até à data. O mais comum acontecimento adverso relacionado com o tratamento foi neutropenia de grau 3 (8,7%) sem acontecimentos adversos de grau 4. Um de 4 pacientes avaliáveis respondeu à terapia.

**Exemplo 19. Ensaio de Fase I de nab-Paclitaxel (Abraxane®) e Carboplatina (apenas para referência)**

O objectivo do presente estudo foi determinar a dose máxima tolerada de Abraxane® (tanto semanal como a cada 3 semanas) com carboplatina AUC = 6 e comparar os efeitos da sequência de administração na farmacocinética (PK).

Foram incluídos pacientes com malignidade histológica ou citologicamente documentada que progrediu após "terapia padrão". No braço 1 receberam Abraxane® a cada 3 semanas num formato de escalação da dose baseado nas toxicidades no ciclo 1 (220, 260, 300, 340 mg/m<sup>2</sup>) a cada 3 semanas seguido por carboplatina AUC = 6. No braço 2 receberam semanalmente (dias 1, 8, 15 seguidos por 1 semana de folga) Abraxane® (100, 125, 150 mg/m<sup>2</sup>) seguido por carboplatina AUC = 6. Para a parte PK do estudo, o Abraxane® foi seguido por carboplatina no ciclo 1 e a ordem de administração inversa no ciclo 2 com níveis PK determinados nas 6, 24, 48 e 72 horas iniciais.

No programa de 3 em 3 semanas, neutropenia, trombocitopenia e neuropatia foram as mais comuns toxicidades de grau 3/4 (3/17 cada). No programa semanal, neutropenia 5/13 foi a mais comum toxicidade de grau 3/4. As melhores respostas a administração semanal na dose mais elevada de 125 mg/m<sup>2</sup> (n = 6) foram 2 respostas parciais (cancro pancreático, melanoma) e 2 doenças estáveis (CPCNP). As melhores respostas à administração a cada três semanas na dose mais elevada de 340 mg/m<sup>2</sup> (n = 5) foram 1 doença estável (CPCNP) e 2 respostas parciais (CPCP, esofágico).

Estes dados indicam actividade da combinação de Abraxane® e carboplatina. A DMT para a administração semanal foi 300 mg/m<sup>2</sup>, e para a administração de uma vez a cada 3 semanas foi 100 mg/m<sup>2</sup>.

**Exemplo 20. Ensaio de Fase II de Dose Densa de Gemcitabina, Epirubicina e nab-Paclitaxel (Abraxane®) (GEA) em Cancro da Mama Localmente Avançado/Inflamatório (apenas para referência)**

Num estudo de fase II, sem ocultação, instituiu-se um regime de terapia de indução/neo-adjuvante antes de intervenção local. O regime de terapia foi gemcitabina a 2000 mg/m<sup>2</sup> i.v. a cada 2 semanas durante 6 ciclos, epirubicina a 50 mg/m<sup>2</sup> a cada 2 semanas durante 6 ciclos, Abraxane® a 175 mg/m<sup>2</sup> a cada 2 semanas durante 6 ciclos, com pegfilgrastim a 6 mg s.c. no dia 2 a cada 2 semanas. O regime de terapia pós-operatória/adjuvante após a intervenção local foi gemcitabina a 2000 mg/m<sup>2</sup> a cada 2 semanas durante 4 ciclos, Abraxane® a 220 mg/m<sup>2</sup> a cada 2 semanas durante 4 ciclos e pegfilgrastim a 6 mg s.c. dia a cada 2 semanas. Os pacientes incluíram fêmeas com adenocarcinoma da mama histologicamente confirmado localmente avançado/inflamatório.

**Exemplo 21. Actividade citotóxica de nab-rapamicina em combinação com Abraxane® em células do músculo liso vascular (apenas para referência)**

Células do músculo liso vascular (VSMC) foram semeadas em placas de 96 poços na presença de concentrações crescentes de nab-rapamicina e 0 µM, 1 µM, 10 µM ou 100 µM de Abraxane® (ABI-007). Para avaliar o efeito citotóxico de nab-rapamicina e Abraxane®, VSMC tratadas foram coradas com homodímero-1 de etídio (Invitrogen, Carlsbad CA) e analisadas quanto a fluorescência de vermelho. O homodímero-1 de etídio é um corante fluorescente de ácido nucleico de alta afinidade, que apenas consegue passar através de membranas comprometidas de células mortas para corar os ácidos nucleicos. Como mostrado na Fig. 7A, a nab-rapamicina, ela própria, exibiu morte celular dependente da dose como demonstrado pela crescente fluorescência. A morte celular pela nab-rapamicina não foi aumentada pelo Abraxane® a 1 µM ou a 10 µM; contudo, foi grandemente aumentada pelo Abraxane® a 100 µM (ANOVA, p < 0,0001). As células coradas com homodímero-1 de etídio como mostrado na Fig. 7A foram também expostas a calceína. A Calceína AM (Invitrogen) é uma molécula não fluorescente que é hidrolisada em calceína fluorescente por esterases citosólicas não específicas. Células vivas expostas a calceína AM exibem fluorescência verde brilhante pois são capazes de gerar o

produto fluorescente e retê-lo. Como mostrado na Fig. 7B, a nab-rapamicina exibiu actividade citotóxica dependente da dose como mostrado por uma quantidade reduzida de coloração fluorescente pela calceína. Esta redução na fluorescência foi melhorada por co-incubação com Abraxane® de uma maneira dependente da dose. Estatística ANOVA originou  $p < 0,0001$  em todas as concentrações de fármaco do Abraxane®.

**Exemplo 22. Actividade citotóxica de nab-rapamicina em combinação com Abraxane® contra xenoenxerto de tumor HT29 (carcinoma do cólon humano) (apenas para referência)**

Ratinhos nus foram implantados com  $10^6$  células HT29 nos seus flancos direitos. Iniciou-se o tratamento logo que os tumores eram palpáveis e eram maiores que  $100-200 \text{ mm}^3$ . Os ratinhos foram aleatoriamente divididos por 4 grupos ( $n= 8$  por grupo). No grupo 1 receberam sol. salina 3 vezes por semana durante 4 semanas, i.v.; no grupo 2 receberam Abraxane® a 10 mg/kg, diariamente durante 5 dias, i.p.; No grupo 3 receberam nab-rapamicina a 40 mg/kg, 3 vezes por semana durante 4 semanas, i.v.; e no grupo 4 receberam nab-rapamicina (40 mg/kg, 3 vezes por semana durante 4 semanas, i.v.) e Abraxane® (10 mg/kg, diariamente durante 5 dias, i.p.). Como mostrado na Fig. 8, a supressão do tumor foi superior para a terapia de combinação de Abraxane® mais nab-rapamicina do que para cada grupo de terapia individual.

**Exemplo 23. Actividade citotóxica de nab-17-AAG em combinação com Abraxane® contra xenoenxerto de tumor H358 (carcinoma do pulmão humano) (apenas para referência)**

Ratinhos nus foram implantados com  $10^7$  células H358 nos seus flancos direitos. Iniciou-se o tratamento logo que os tumores eram palpáveis e eram maiores que  $100-200 \text{ mm}^3$ . Os ratinhos foram aleatoriamente divididos por 4 grupos ( $n= 8$  por grupo). No grupo 1 receberam sol. salina 3 vezes por semana durante 4 semanas, i.v.; No grupo 2 receberam Abraxane® a 10 mg/kg, diariamente durante 5 dias, i.p.; No grupo 3 receberam nab-17-AAG a 80 mg/kg, 3 vezes por semana durante 4 semanas, i.v.; e No grupo 4 receberam nab-17-AAG (80 mg/kg, 3 vezes por semana durante 4 semanas, i.v.) e Abraxane® (10 mg/kg, diariamente durante 5 dias, i.p.). Como mostrado na Fig. 9, a supressão do tumor foi superior para a terapia de

combinação de nab-17-AAG mais Abraxane® do que para cada grupo de terapia individual.

**Exemplo 24. O Abraxane® (ABI-007) reduz o crescimento tumoral em xenoenxertos de tumor humano MDA-MB-231 e induz necrose, hipoxia e expressão de VEGF-A.**

Xenoenxertos de cancro da mama humano MDA-MB-231 foram ortotopicamente implantados nas almofadas de gordura mamária de ratinhos nus (*nu/nu*) fêmeas. Quando o volume tumoral médio era de 230 mm<sup>3</sup>, os ratinhos foram aleatoriamente divididos por grupos de cinco animais e tratados com sol. salina, Taxol®, Abraxane® ou doxorrubicina. O Taxol® foi administrado a 10 mg/kg/dia, o Abraxane® foi administrado a 15 mg/kg/dia, e a doxorrubicina foi administrada a 10 mg/kg/dia. Todos os fármacos e a sol. salina de controlo foram administrados i.v. num volume de 100 µl diariamente durante 5 dias. Os ratinhos foram sacrificados, os tumores foram recolhidos e prepararam-se extractos celulares do tumor. Os níveis de proteína VEGF-A nos extractos tumorais foram determinados por ELISA. Em alguns casos, os tumores de ratinhos tratados com Abraxane® foram analisados por histologia.

**TABELA 4**

Tratamento	Programa de Dosagem	Volume tumoral médio (mm <sup>3</sup> )	% ICT	VEGF-A (pg/mg de proteína)
Controlo de sol. salina	100 µl qdx5	523 ± 79		337 ± 51
Taxol®	10 mg/kg/dia	231 ± 32	56	664 ± 66
	qdx5			
Abraxane®	15 mg/kg/dia qdx5	187 ± 29	64	890 ± 82
Doxorrubicina	10 mg/kg/dia qdx5	287 ± 56	45	754 ± 49

Como mostrado na Tabela 4, o Taxol®, o Abraxane® e a doxorrubicina, todos inibiram o crescimento tumoral como representado por uma redução no volume do tumor quando comparado com os animais de controlo tratados com sol. salina. A inibição do crescimento tumoral (ICT) foi calculada comparando o volume tumoral médio nos grupos de teste com o do grupo de controlo na última medição do grupo de controlo. A

inibição do crescimento tumoral foi maior nos ratinhos tratados com Abraxane® (64% de inibição). O Taxol® e a doxorrubicina apresentaram inibição do crescimento tumoral de 56% e 45%, respectivamente.

Os níveis de proteína VEGF-A em extractos celulares tumorais foram medidos por ELISA e mostrou-se que estão aumentados em tumores de ratinhos tratados com Taxol®, Abraxane® e doxorrubicina. Os níveis de proteína VEGF-A foram superiores nos tumores de ratinhos tratados com Abraxane® (164% de aumento), seguidos pela doxorrubicina (124%) e pelo Taxol® (97%).

Os tumores foram colhidos de ratinhos de controlo tratados com sol. salina e de ratinhos tratados com Abraxane® uma semana após a última injecção de Abraxane®. Os tumores foram avaliados quanto a locais de necrose e quanto à presença de células hipóxicas. As células hipóxicas foram identificadas por detecção imuno-histoquímica de conjugados pimonidazole-proteína. Como mostrado na Figura 10, a inibição de crescimento tumoral em ratinhos tratados com Abraxane® foi acompanhada por necrose (Fig. 10B) e hipoxia (Fig. 10D) no tecido tumoral. Não foi observada necrose nem hipoxia em tecido tumoral de ratinhos de controlo tratados com sol. salina (Fig. 10A e Fig. 10C).

**Exemplo 25. Efeitos de VEGF-A e Avastin® sobre a citotoxicidade induzida por Abraxane® *in vitro***

Em adição à estimulação da angiogénesis tumoral por actuação sobre células endoteliais vasculares, é possível que a VEGF-A segregada também possa actuar sobre células tumorais que exibem receptores de VEGF-A (VEGF-R). As células MDA-MB-231 expressam VEGF-R2, enquanto as células HepG2 expressam VEGF-R1 e as células de tumor da próstata PC3 expressam VEGF-R1 e VEGF-R2 (dados não mostrados).

O efeito de VEGF-A ou um anticorpo anti-VEGF (Avastin®) sobre a citotoxicidade induzida por Abraxane® foi avaliado num ensaio da citotoxicidade celular *in vitro*. As células foram tratadas com Abraxane® numa gama de concentrações (1 a 24 nM). As células foram também tratadas com VEGF-A ou Avastin® e a

citotoxicidade foi comparada com células tratadas com Abraxane® apenas. Como mostrado na Fig. 11A, a adição de VEGF-A reduziu a citotoxicidade *in vitro* do Abraxane®. Em contraste, a adição de Avastin® aumentou a citotoxicidade *in vitro* do Abraxane® (Fig. 11A).

Observaram-se resultados similares num ensaio clonogénico *in vitro*. As células foram tratadas com controlo de sol. salina, Abraxane® sozinho, VEGF-A sozinha, Avastin® sozinho, Abraxane® + VEGF-A ou Abraxane® + Avastin®. Como mostrado na Fig. 11B, o Abraxane® reduziu o número médio de colónias formadas em comparação com o controlo de sol. salina. O tratamento com VEGF-2 sozinha aumentou o número de colónias formadas, enquanto o tratamento com Avastin® sozinho resultou numa ligeira redução no número de colónias formadas. A adição de VEGF-A a células tratadas com Abraxane® reduziu o efeito citotóxico que resultou num maior número de colónias formadas em comparação com Abraxane® sozinho. A adição de Avastin® a células tratadas com Abraxane® pareceu ter um efeito sinérgico demonstrando um aumento na citotoxicidade (como demonstrado por uma diminuição acentuada no número de colónias formadas) relativamente ao nível observado com Abraxane® ou Avastin® sozinhos.

**Exemplo 26. O Abraxane® (ABI-007) em combinação com Avastin® reduz o crescimento tumoral em xenoenxertos de tumor MDA-MB-231**

Xenoenxertos de cancro da mama humano que expressam luciferase MDA-MB-231 foram ortotopicamente implantados nas almofadas de gordura mamária de ratinhos nus (*nu/nu*) fêmeas. Quando o volume tumoral médio atingiu 230 mm<sup>3</sup>, os ratinhos foram aleatoriamente distribuídos por grupos de cinco animais e tratados com sol. salina, Abraxane®, Avastin®, ou uma combinação de Abraxane® mais Avastin®. O Abraxane®, sozinho ou em combinação, foi administrado a 10 mg/kg/dia diariamente durante 5 dias em dois ciclos separados por 1 semana. O Avastin® foi administrado após os dois ciclos de Abraxane® em dosagens de 2 mg/kg, 4 mg/kg ou 8 mg/kg, duas vezes por semana durante 6 semanas. O Avastin® sozinho foi administrado numa dosagem de 4 mg/kg ao mesmo tempo que para os ratinhos na terapia de combinação. Os ratinhos foram monitorizados quanto ao crescimento tumoral e à toxicidade dos fármacos. Os

ratinhos foram sacrificados quando o volume tumoral médio no grupo de controlo tratado com sol. salina atingiu 2000 mm<sup>3</sup>.

TABELA 5

Tratamento	Dose de Avastin®	Volume tumoral médio (mm <sup>3</sup> )	%ICT	% da Regressão Completa <sup>3</sup>
Controlo de sol. salina		2391 ± 432		0
Abraxane®(ABX)		117 ± 38	95,11	0
Avastin®	4 mg/kg	2089 ± 251	12,56	0
ABX + Avastin®	2 mg/kg	138 ± 42	94,23	20 (1/5)
ABX + Avastin®	4 mg/kg	60 ± 17	97,49	40 (2/5)
ABX + Avastin®	8 mg/kg	36 ± 16	98,49	40 (2/5)

Não foi observada toxicidade em nenhum grupo de tratamento. A inibição do crescimento tumoral (ICT) foi calculada comparando o volume tumoral médio de grupos de teste com o do grupo de controlo na última medição do grupo de controlo. Como mostrado na Tabela 5 e na Fig. 12, o Avastin® numa dose de 4 mg/kg não inibe significativamente o crescimento de tumores primários (12,56% de inibição). A terapia de combinação com Abraxane® e Avastin® originou um resultado significativamente melhor do que o Avastin® sozinho, com a inibição tumoral variando de 94,23% para 98,49%. O Abraxane® em combinação com Avastin® nas duas maiores doses, originou um melhor resultado do que o Abraxane® sozinho (97,49 ou 98,49% comparado com 95,11% de inibição). O Abraxane® e o Avastin® em combinação resultaram em regressão de tumores em ratinhos tratados em que foi referida regressão completa para ratinhos sem tumores mensuráveis no dia 65. Cinco de quinze (30%) ratinhos tratados com a combinação de Abraxane® e Avastin® apresentaram regressão completa do tumor; os tumores nos restantes ratinhos foram reduzidos em 90% comparativamente com os controlos.

**Exemplo 27. O Abraxane® (ABI-007) em combinação com Avastin® reduz a metástase tumoral em xenoenxertos de tumor MDA-MB-231**

Como descrito no Exemplo 25, xenoenxertos de cancro da mama humano MDA-MB-231 que expressam luciferase foram ortotopicamente implantados nas almofadas de gordura mamária

de ratinhos nus (*nu/nu*) fêmeas. Quando o volume tumoral médio atingiu 230 mm<sup>3</sup>, os ratinhos foram aleatoriamente distribuídos por grupos e tratados com sol. salina (n=10), Abraxane® (n=5), Avastin® (n=5), ou uma combinação de Abraxane® mais Avastin® (n=5). O Abraxane®, sozinho ou em combinação, foi administrado a 10 mg/kg/dia diariamente durante 5 dias em dois ciclos separados por 1 semana. O Avastin® foi administrado após os dois ciclos de Abraxane® em dosagens de 2 mg/kg, 4 mg/kg ou 8 mg/kg, duas vezes por semana durante 6 semanas. O Avastin® sozinho foi administrado numa dosagem de 4 mg/kg ao mesmo tempo que os ratinhos na terapia de combinação. Os ratinhos foram sacrificados quando o volume tumoral médio no grupo de controlo tratado com sol. salina atingiu 2000 mm<sup>3</sup>. Os nódulos linfáticos auxiliares e ambos os lóbulos dos pulmões foram removidos de cada ratinho e preparam-se extractos celulares. A presença de células MDA-MB-231 nestes tecidos foi avaliada por análise da actividade da luciferase e foi um indicador de metástase dos tumores primários. A actividade de luciferase foi medida em extractos de 10 nódulos linfáticos e ambos os lóbulos dos pulmões no dia do sacrifício (dia 65 após a implantação do tumor). Um valor superior a 500 unidades de luz por 20 µl de lisado foi classificado como positivo para a presença de células MDA-MB-231 e para incidência de metástase.

**TABELA 6**

<b>Tratamento</b>	<b>Dose de Avastin®</b>	<b>Metástase nos nódulos linfáticos</b>		<b>Metástase pulmonar</b>	
		<b>Incidência</b>	<b>Valor P</b>	<b>Incidência</b>	<b>Valor P</b>
Controlo de sol. salina		10/10 (100%)		7/10 (70%)	
Abraxane® (ABX)		5/5 (100%)	-	4/5 (80%)	-
Avastin®	4 mg/kg	5/5 (100%)	-	3/5 (60%)	NS
ABX + Avastin®	2 mg/kg	5/5 (100%)	-	1/5 (20%)	0,045
ABX + Avastin®	4 mg/kg	2/5 (40%)	0,022	2/5 (40%)	NS
ABX + Avastin®	8 mg/kg	2/5 (40%)	0,022	0/5 (0%)	0,025

Como mostrado na Tabela 6, o tratamento com Abraxane® ou Avastin® sozinhos pareceu não ter efeito sobre a incidência de

metástase tumoral para os nódulos linfáticos como analisado pela actividade de luciferase em extractos celulares. Como aqui se utiliza, a incidência refere-se à presença de actividade de luciferase em tecido de cada ratinho. O Abraxane® em combinação com Avastin® demonstrou um efeito significativo sobre a metástase tumoral. A incidência de metástases caiu para 40% em grupos tratados com Abraxane® e Avastin® nas duas maiores dosagens de mg/kg e 8 mg/kg. (valor P = 0,022; em que o valor P foi gerado pela análise da diferença entre grupos de teste e de controlo com teste exacto de Fisher; NS refere-se a não Significativo). O Abraxane® ou o Avastin® sozinhos pareceram ter pouco efeito sobre a incidência de metástase tumoral para os pulmões como mostrado na Tabela 6. O Abraxane® em combinação com Avastin® demonstrou um efeito sobre a incidência de metástases pulmonares. A incidência de metástases caiu para 20%, 40% e 0% com combinações de Abraxane® e Avastin® em dosagens de 2 mg/kg, 4 mg/kg e 8 mg/kg, respectivamente.

A metástase tumoral para os nódulos linfáticos e pulmões avaliada pela actividade de luciferase em extractos de tecidos está mostrada na Fig. 13. A combinação de Abraxane® e Avastin® teve um efeito sinérgico na redução de metástases para os nódulos linfáticos (Fig. 13A) e metástases pulmonares (Fig. 13B) das células tumorais MDA-MB-231.

**Exemplo 28. A quimioterapia com paclitaxel aumenta a densidade de microvasos nos tumores**

Formulações de paclitaxel à base de solvente (*i.e.*, Taxol®) e isentas de solvente (*i.e.*, nab-paclitaxel, Abraxane®) foram ensaiadas quanto à sua capacidade para reduzir o volume tumoral e para aumentar a densidade de microvasos ("DMV") nos tumores. Em experiências paralelas, cada uma contendo quatro grupos de cinco ratinhos portadores de xenoenxertos de MX-1 sensível a paclitaxel, xenoenxertos de MES-SA sensível a paclitaxel ou xenoenxertos de MES-SA/Dx5 resistente a paclitaxel, estes foram tratados com: (1) Taxol® a 13,4 mg/kg administrado uma vez por dia durante cinco dias consecutivos ("qdx5"); (2) Abraxane® a 13,4 mg/kg qdx5; (3) Abraxane® a 30 mg/kg qdx5; ou (4) um volume comparável de sol. salina tamponada com fosfato ("PBS") qdx5. Numa experiência, o

volume tumoral foi avaliado duas vezes por semana começando no dia 17. Na segunda experiência, a DMV foi quantificada por coloração CD31 no dia 11, o último dia da experiência. A DMV foi reportada como a percentagem de estruturas positivas para CD31 em cada tecido relativamente ao volume tumoral.

Como mostrado na Figura 14A, a inibição do crescimento tumoral confirmou que MES-SA/Dx5 é resistente a paclitaxel e que MX-1 e MES-SA são sensíveis a paclitaxel. Como mostrado na Figura 14B, a DMV aumentou com a diminuição do tumor. Para MX-1, a DMV aumentou de  $1,08 \pm 0,65\%$  (PBS) para  $4,93 \pm 3,22\%$  (Taxol® a 13,4 mg/kg),  $9,03 \pm 13,0\%$  (Abraxane® a 13,4 mg/kg), e  $9,18 \pm 11,19\%$  (Abraxane® a 30 mg/kg). Para MES-SA, a DMV aumentou de  $3,96 \pm 3,68\%$  (PBS), para  $7,33 \pm 1,30\%$  (Taxol® a 13,4 mg/kg),  $3,33 \pm 1,03\%$  (Abraxane® a 13,4 mg/kg), e  $11,69 \pm 7,51\%$  (Abraxane® a 30 mg/kg). Para MES-SA/Dx5, a DMV permaneceu estável a  $4,16 \pm 2,39\%$ ,  $4,11 \pm 0,55\%$  (Taxol® a 13,4 mg/kg),  $4,13 \pm 2,30\%$  (Abraxane® a 13,4 mg/kg), e  $2,52 \pm 1,08\%$  (Abraxane® a 30 mg/kg). Em MX-1 e MES-SA, ambos sensíveis a paclitaxel, houve uma correlação positiva entre a diminuição do volume tumoral e o aumento da DMV (comparem-se os painéis de MX-1 nas Fig. 14A e 14B e os painéis de MES-SA nas Fig. 14A e 14B). Não houve alteração observável no volume tumoral e na DMV em MES-SA/Dx5 resistente a paclitaxel após tratamento com Taxol® a 13,4 mg/kg, com nenhuma concentração de Abraxane®, ou com PBS. O quarto painel da Figura 14B mostra os dados de DMV para todos os três tipos de tumor representados em conjunto. Os dados indicaram que os tumores que sofrem regressão induzida por paclitaxel exibiram DMV aumentada, reflectindo uma angiogénesis aumentada em resposta à quimioterapia, e que a relação foi log linear.

**Exemplo 29. A administração de Avastin® em combinação com Abraxane® (ABI-007) melhora significativamente a supressão tumoral induzida pelo Abraxane® (ABI-007) sozinho.**

A actividade antitumoral do Abraxane® sozinho e em combinação com bevacizumab (Avastin®) foi ensaiada *in vivo*. Xenoenxertos de cancro da mama humano MDA-MB-231-Luc+ foram ortotopicamente implantados nas almofadas de gordura mamária ("AGM") de ratinhos nus (*nu/nu*) fêmeas de 4 a 6 semanas de idade (Harlan Sprague-Delaney, Indianapolis, IN), de acordo

com métodos padrão. Os ratinhos portadores de tumores MDA-MB-231 de 200-250 mm<sup>3</sup> de volume foram aleatoriamente distribuídos por 6 grupos de 10 animais cada e foram tratados com: (1) PBS; (2) Abraxane® sozinho (10 mg/kg, administrado intravenosamente ("i.v.") qdx5); (3) Avastin® sozinho (4 mg/kg, administrado por injecção intraperitoneal ("i.p.") três vezes por semana ("q3xwkly")); ou (4) Abraxane® seguido por Avastin®. O tratamento com Avastin® começou 24 horas após o final de um ciclo de Abraxane®, numa dose de 2 mg/kg, 4 mg/kg ou 8 mg/kg de Avastin® dissolvida em 0,1 mL de sol. salina estéril e injectado intraperitonealmente q3xwkly durante 5 semanas. Foram administrados um ou dois ciclos de Abraxane®. No tratamento de dois ciclos de Abraxane®, um segundo ciclo de Abraxane® (10 mg/kg, i.v. qdx5) foi administrado uma semana após a conclusão do primeiro ciclo. O grupo de controlo recebeu sol. salina administrada no mesmo volume pelo mesmo método (*i.e.*, 0,1 ml injectados i.v. ou i.p.) nos mesmos dias que os tratamentos com Abraxane® e com Avastin®, respectivamente.

Realizaram-se dois conjuntos de experiências com ratinhos portadores de tumores derivados de MDA-MS-231 que expressa luciferase para comparar a eficácia de um ou dois ciclos qdx5 de quimioterapia com Abraxane® combinado com Avastin®. Não se observaram sinais de toxicidade como avaliado pela perda de peso ou por alterações comportamentais em nenhum dos ratinhos tratados. Uma análise comparativa de ambas as experiências apresentadas na Figura 15 e na Tabela 7 mostrou que dois ciclos de Abraxane® (10 mg/kg) foram significativamente mais eficazes na supressão do crescimento tumoral do que um ciclo ( $p < 0,05$ ). A Figura 15 apresenta dados da terapia de combinação com Abraxane® a 10 mg/kg e Avastin® a 4 mg/kg.

**TABELA 7**

<b>Tratamento</b>	<b>Dose de Avastin®</b>	<b>Volume tumoral médio (mm<sup>3</sup>)<sup>1</sup></b>	<b>%TGI<sup>2</sup></b>	<b>%TGD<sup>3</sup></b>	<b>% da Regressão Completa<sup>4</sup></b>
<b>Experiência N.º 1: um ciclo de Abraxane® (10 mg/kg)</b>					
Controlo de sol. salina		2079 ± 287			0
Abraxane® (ABX)		596 ± 98	71,33	20	0
Avastin®	2 mg/kg	953 ± 127	54,16	13	0
ABX + Avastin®	2 mg/kg	255 ± 46	87,73	33	0
<b>Experiência N.º 2: dois ciclos de Abraxane® (10 mg/kg)</b>					
Controlo de sol. salina		2391 ± 432			0
Abraxane® (ABX)		117 ± 38	95,11	>65 <sup>5</sup>	0
Avastin®	4 mg/kg	2089 ± 251	12,56	7	0
ABX + Avastin®	2 mg/kg	138 ± 42	94,23	>65 <sup>e</sup>	20 (1/5)
ABX + Avastin®	4 mg/kg	60 ± 17	97,49	>65 <sup>e</sup>	40 (2/5)
ABX + Avastin®	8 mg/kg	36 ± 16	98,49	>65 <sup>e</sup>	40 (2/5)

<sup>1</sup> O volume tumoral médio por grupo (n=5) ± EP no dia do sacrifício no grupo de controlo tratado com PBS porque os seus tumores atingiram o limite de 2000 mm<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> Percentagem de redução no volume tumoral médio em grupos tratados com fármaco em comparação com a do grupo tratado com PBS no último dia de medição dos ratinhos de controlo.

<sup>3</sup> A retardação do crescimento tumoral ("RCT") indica o número de dias adicionais necessários para a média do volume tumoral em grupos experimentais atingir 1000 mm<sup>3</sup> em comparação com o do grupo de controlo tratado com PBS. O grupo de controlo atingiu 1000 mm<sup>3</sup> no dia 25 após a implantação do tumor.

<sup>4</sup> Percentagem de ratinhos sem tumores mensuráveis no dia 65 após a implantação do tumor. Os números entre parêntesis indicam o número de ratinhos com tumores que regrediram completamente em cada grupo.

<sup>5</sup> O RCT não pode ser precisamente determinado porque o volume tumoral médio não atingiu 1000 mm<sup>3</sup> no final da experiência (dia 65 após a implantação do tumor).

Como mostrado na Tabela 7, o volume tumoral médio após um ciclo de Abraxane® foi de  $596 \pm 98 \text{ mm}^3$ , correspondendo a 71% de ICT comparativamente com o volume tumoral médio no grupo de controlo, enquanto o volume tumoral médio após dois ciclos de Abraxane® foi de  $117 \pm 38 \text{ mm}^3$ , correspondendo a 95% de ICT comparativamente com o volume tumoral médio no grupo de controlo. Um ciclo de Abraxane® retardou o ponto temporal no qual o volume tumoral atingiu  $1000 \text{ mm}^3$  em 20 dias relativamente aos animais de controlo. Em contraste, o volume tumoral médio no grupo que recebeu dois ciclos de Abraxane® não atingiu os  $1000 \text{ mm}^3$  ao longo da duração da experiência, desse modo prolongando a retardaçāo do crescimento tumoral ("RCT") para um mínimo de 65 dias. O Avastin® sozinho (4 mg/kg) produziu pouco efeito (Figura 15A) a não significativo (Figura 15B) sobre o crescimento tumoral, uma vez que as experiências foram realizadas em ratinhos com tumores bem estabelecidos ( $100-150 \text{ mm}^3$  no primeiro dia de tratamento).

Adicionalmente, os resultados demonstraram que a terapia de combinação com Abraxane® e Avastin® produziu uma supressão sinérgica do crescimento tumoral comparativamente com cada fármaco administrado sozinho. Mesmo tendo o Abraxane® sozinho potencialmente inibido o crescimento tumoral, particularmente com terapia em dois ciclos, o crescimento tumoral voltou em todos os ratinhos independentemente da extensão da supressão tumoral e da retardaçāo do crescimento tumoral, e não se observaram regressões completas em nenhum dos ratinhos tratados com Abraxane® ou Avastin® sozinhos. Em contraste, os ratinhos que receberam terapia de combinação tinham tumores menores em média comparativamente com os de todos os outros grupos experimentais ( $p<0,05$ ). Em adição, vários ratinhos apresentaram mesmo tumores não mensuráveis ou não detectáveis visualmente (Figura 15B e Tabela 7) após receberem dois ciclos de Abraxane® em combinação com 2, 4 ou 8 mg/kg de Avastin®. Embora o número relativamente pequeno de ratinhos por grupo não permitisse estabelecer uma dependência directa da dose em relação às concentrações de Avastin®, houve uma tendência mostrando que doses maiores de Avastin® pareciam estar associadas a um número superior de ratinhos com tumores que regrediram completamente (Tabela 7).

**Exemplo 30. A terapia de combinação com Abraxane® (ABI-007) e Avastin®, mas não com Abraxane® (ABI-007) ou Avastin® sozinhos, resultou em regressões tumorais completas e sustentáveis em todos os ratinhos tratados**

Ratinhos portadores de tumores derivados de MDA-MB-231 foram gerados como descrito no Exemplo 29. Os ratinhos portadores de tumores de 200-250 mm<sup>3</sup> de volume foram aleatoriamente distribuídos por 6 grupos de 10 animais cada e foram tratados com: (1) PBS; (2) Avastin® sozinho (4 mg/kg, administrado por injecção intraperitoneal ("i.p.") duas vezes por semana ("q2wkly")); (3) Abraxane® sozinho (30 mg/kg, administrado intravenosamente ("i.v.") qdx5); ou (4) Abraxane® seguido por Avastin®. Iniciou-se o tratamento com Avastin® 24 horas após a primeira injecção de Abraxane® e continuou-se até ao final da experiência numa dose de 4 mg/kg de Avastin® dissolvidos em 0,1 mL de sol. salina estéril, injectados intraperitonealmente q2wkly durante 5 semanas. Foram administrados dois ciclos de Abraxane® (ambos a 10 mg/kg, i.v. qdx5), separados por uma semana. O grupo de controlo recebeu sol. salina administrada no mesmo volume pelo mesmo método (*i.e.*, 0,1 ml injectados i.v. ou i.p.) nos mesmos dias que os tratamentos com Abraxane® e com Avastin®, respectivamente.

O volume do tumor foi avaliado três vezes por semana até à conclusão do estudo. Um resumo dos dados está apresentado na Figura 16. Notavelmente, embora dois ciclos de Abraxane® (30 mg/kg) sozinho suprimissem efectivamente o crescimento tumoral, os tumores voltaram a crescer aproximadamente duas semanas após o final do segundo ciclo de Abraxane®, embora um pouco mais lentamente do que em ratinhos tratados com Avastin® (4 mg/kg) sozinho ou nos animais de controlo injectados com PBS. Em contraste, dois ciclos de Abraxane® (30 mg/kg) administrado em combinação com Avastin® (4 mg/kg) não apenas suprimiram efectivamente o crescimento tumoral, como resultaram numa regressão praticamente completa dos tumores até ao final da experiência, 95 dias após a implantação do tumor.

**Exemplo 31. A terapia de combinação com Abraxane® (ABI-007) e Avastin® inibe o crescimento tumoral, a metástase linfática e pulmonar, em ratinhos com tumores derivados de MDA-MB-435-Luc+.**

A linha celular MDA-MB-435 marcada com luciferase ("MDA-MB-435-Luc+") foi uma generosa oferta do Dr. Sierra (Universitaria de Bellvitge, Barcelona, Espanha), e foi caracterizada noutros estudos. Rubio, N., et al. (2001), "Metastatic behavior of human breast carcinomas overexpression the Bcl-x(L) gene: a role in dormancy and organospecificity", *Lab. Invest.* 8:725-34. A linha celular MDA-MB-435-Luc+ tem alto potencial metastático, predominantemente para os pulmões e, em menor grau, para os nódulos linfáticos. O meio de cultura para todas as linhas tumorais consistiu em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado com 5% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e aminoácidos não essenciais. As células tumorais foram colhidas para passagem por lavagem da monocamada de células com PBS, seguida por exposição de 3-4 minutos a EDTA 0,5 mM diluído em PBS. As células foram sub-cultivadas duas vezes por semana e testadas por rotina quanto a micoplasma utilizando um kit de imunodetecção de Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Alemanha).

As células MDA-MB-435-Luc+ ("435-Luc+") foram implantadas subcutaneamente na almofada de gordura mamária de ratinhos ICR SCID fêmeas de 4 a 6 semanas de idade (Taconic, Hudson, NY). A cada 2-3 dias, mediram-se os diâmetros perpendiculares dos tumores através de um calibrador digital e utilizaram-se para calcular o volume tumoral de acordo com a equação: volume =  $Dd^2 / 6$ , onde D = diâmetro maior e d = diâmetro menor. Os tumores 435-Luc+ tinham uma velocidade de proliferação idêntica à das suas contrapartidas não transfectadas (ratinhos portadores de tumores ortotópicos derivados de 435-MBA-MS). Os cuidados com os animais foram de acordo com as orientações institucionais.

Os ratinhos portadores de tumores 435-Luc<sup>+</sup> de 200-250 mm<sup>3</sup> de volume foram aleatoriamente distribuídos por 6 grupos de 5 animais cada, e tratados com PBS, Abraxane® ("ABX") sozinho (10 mg/kg, i.v., qdx5), Avastin® sozinho (4 mg/kg, i.p., duas vezes por semana) ou Abraxane® seguido por Avastin®. Foram administrados dois ciclos de tratamento com Abraxane®, cada um

durante 5 dias consecutivos com uma semana de intervalo entre ciclos. O tratamento com Avastin® começou 24 horas após o final do tratamento de um ciclo de Abraxane®, com uma dose de 4 mg/kg dissolvidos em 0,1 ml de PBS estéril, isento de endotoxinas, e injectados i.p., duas vezes por semana, durante um total de 5 semanas. O grupo de controlo recebeu PBS injectado i.v. ou i.p. (0,1 ml) nos mesmos dias que os tratamentos com Abraxane® e com Avastin®, respectivamente. Para permitir o desenvolvimento máximo de focos metastáticos, os ratinhos foram sacrificados quando o volume tumoral médio no grupo de controlo atingiu 2000 mm<sup>3</sup>. A Tabela 8 mostra o efeito de Abraxane®, Avastin®, e terapia de combinação com Abraxane® e Avastin® sobre o crescimento tumoral no modelo de tumor MDA-MB-435-Luc+.

**TABELA 8**

<b>MDA-MB-435-Luc+</b>				
<b>Tratamento</b>	<b>Avastin® (mg/kg)</b>	<b>Volume Tumoral (mm<sup>3</sup>)<sup>6</sup></b>	<b>%TGI<sup>7</sup></b>	<b>% de Regressões Completas<sup>8</sup></b>
Controlo		2020		0
ABX sozinho		369	81.73	0
Avastin sozinho	4	792	60.79	0
ABX + Avastin®	4	167	91.73	0

<sup>6</sup> O volume tumoral representa o volume tumoral médio por grupo, expresso em milímetros cúbicos ("mm<sup>3</sup>").

<sup>7</sup> A inibição do crescimento tumoral ("ICT") está apresentada como a percentagem de redução no volume tumoral médio em grupos experimentais comparativamente com o de grupos de controlo tratados com PBS.

<sup>8</sup> Regressão completa foi definida como a ausência de tumor mensurável ou palpável no local original da injeção do tumor durante todo o período da experiência, que foi de 92 dias.

A metástase tumoral foi determinada por medição da actividade de luciferase em extractos de tecidos derivados de 10 nódulos linfáticos auxiliares ("LN") e ambos os lóbulos dos pulmões. Os nódulos linfáticos e os pulmões foram excisados, lavados com PBS, e homogeneizados em 0,35 ml de tampão CCLR frio (Promega, Madison, WI) contendo um cocktail de inibidores de protease e PMSF (Sigma, MO). Removeram-se os detritos celulares por centrifugação. As concentrações de proteína dos

lisados clarificados foram determinadas pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Misturaram-se cinquenta  $\mu$ l de Reagente do Ensaio da Luciferase (Promega, Madison, WI) com 10  $\mu$ l de lisado clarificado e foi detectada uma média de 10 segundos de luminescência utilizando um luminómetro de tubo simples (Berthold, Alemanha). O tampão CCLR sem homogenatos de tecidos e nódulos linfáticos ou pulmões de ratinhos não portadores de tumor foram ensaiados para obter o sinal de fundo que foi subtraído aos resultados. Os resultados líquidos foram expressos como unidades de luz relativas ("RLU") normalizadas por mg de proteína total do lisado. Para avaliar a incidência de metástase, os extractos que tinham um sinal de luminescência de 800 unidade de luz acima do fundo (aproximadamente 100 unidades de luz) foram classificados como positivos. Este valor foi escolhido porque foi o sinal mínimo reprodutivelmente detectado acima do fundo em tecidos metastáticos, independentemente confirmado por detecção imuno-histoquímica (dados não mostrados). As diferenças em metástases nos nódulos linfáticos e pulmonares foram avaliadas quanto a significância estatística pelo teste exacto de Fisher utilizando GraphPad InStat (GraphPad Inc., San Diego, CA) ou SPSS 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

As metástases de células tumorais MDS-MB-435-Luc<sup>+</sup> foram identificadas por medição da actividade de luciferase em extractos de tecidos de nódulos linfáticos e pulmões. A incidência de metástase está apresentada na Tabela 9. Em grupos de terapia de combinação, ratinhos portadores de tumores 435-Luc<sup>+</sup> receberam uma dose de 4 mg/kg de Avastin®. Como esperado, 100% dos ratinhos portadores de tumores 435-Luc<sup>+</sup> de controlo tinham metástases pulmonares, enquanto apenas 50% dos controlos tinham metástases nos nódulos linfáticos (Tabela 9).

TABELA 9

<b>MDA-MB-435-Luc+</b>				
<b>Metástase nos nódulos linfáticos</b>				
<b>Tratamento</b>	<b>Avastin® (mg/kg)</b>	<b>Incidência<sup>9</sup> N/total (%)</b>	<b>% Inibição vs. Controlo</b>	<b>valor P</b>
Controlo		4/8 (50)		
ABX sozinho		0/6 (0)	100	0,01
Avastin sozinho	4	0/6 (0)	100	0,01
ABX + Avastin®	4	0/6 (0)	100	0,01
<b>Metástase Pulmonar</b>				
<b>Tratamento</b>	<b>Avastin® (mg/kg)</b>	<b>Incidência N/total (%)</b>	<b>% Inibição vs. Controlo</b>	<b>valor P</b>
Controlo		7/7 (100)		
ABX sozinho		5/6 (83)	17	NS <sup>10</sup>
Avastin sozinho	4	4/8 (50)	50	0,01
ABX + Avastin®	4	2/8 (25)	75	0,001

<sup>9</sup> A actividade de luciferase foi medida em extractos de 10 nódulos linfáticos e ambos os lóbulos dos pulmões de cada ratinho. Amostras contendo um mínimo de 500 unidades de luz por 20 µl de lisado foram classificadas como positivas. Os lisados de tecidos de ratinhos não portadores de tumor produziram um sinal de luminescência de 100 unidades de luz, que foi considerado o fundo e foi subtraído aos valores positivos. Os resultados estão apresentados como o número de ratinhos com metástase nos nódulos linfáticos ou nos pulmões por número total de ratinhos com tumores em cada grupo experimental. A percentagem de ratinhos com metástases está apresentada entre parêntesis.

<sup>10</sup> NS = Não significativo. A diferença entre os grupos experimental e de controlo não atinge significância estatística quando analisada pelo teste exacto de Fisher.

Embora nem o Abraxane® (10 mg/kg) nem o Avastin® (4 mg/kg) tenham suprimido eficazmente a metástase pulmonar em ratinhos portadores de tumores 435-Luc+, notavelmente, a combinação Abraxane®/Avastin® supriu significativamente a metástase pulmonar, e reduziu o número de ratinhos com tumores pulmonares em 75% comparativamente com o controlo injectado com PBS. (Tabela 9). Em contraste, o Abraxane® (10 mg/kg) sozinho, o Avastin® (4 mg/kg) sozinho, e a terapia de combinação com Abraxane®/Avastin® todos suprimiram a metástase nos nódulos linfáticos. Estes resultados indicam que a terapia

de combinação com Abraxane® e Avastin® pode ser particularmente benéfica para a supressão de metástase tanto nos nódulos linfáticos como pulmonar.

**Exemplo 32. A terapia de combinação com Abraxane® (ABI-007) e Avastin® erradicou a metástase linfática e pulmonar em ratinhos com tumores derivados de MDA-MB-231 ou MDA-MB-231-Luc+**

As células MDA-MB-231 ou 231-Luc<sup>+</sup> foram implantadas nas AGM de ratinhos *nu/nu* fêmeas de 4 a 6 semanas de idade (Harlan Sprague-Delaney, Indianapolis, IN) por métodos padrão. Resumidamente, os ratinhos foram anestesiados e injectaram-se 100 µl de suspensão celular contendo  $4 \times 10^6$  células e 50% de Matrigel (Sigma, MO) na AGM. A cada 2-3 dias, mediram-se os diâmetros perpendiculares do tumor através de um calibrador digital e utilizaram-se para calcular o volume tumoral de acordo com a equação: Volume =  $Dd^2 / 6$ , onde D = diâmetro maior e d = diâmetro menor. Os tumores 231-Luc<sup>+</sup> tinham uma velocidade de proliferação idêntica à das suas contrapartidas não transfectadas. Os cuidados com os animais foram de acordo com as orientações institucionais.

Os xenoenxertos de MDA-MB-231 ortotópicos que expressam luciferase (231-Luc+) foram crescidos até tumores bem estabelecidos (~460 mm<sup>3</sup>) e os animais foram aleatoriamente distribuídos por quatro grupos de N=5, 6 ou 7. Os grupos foram tratados com: (1) Abraxane® (30 mg/kg, qdx5) sozinho; (2) Avastin® (4 mg/kg, q2xwkly durante a duração da experiência) sozinho; (3) dois ciclos de Abraxane® (30 mg/kg, qdx5) em combinação com Avastin® (4 mg/kg, q2xwkly durante a duração); ou (4) com um volume idêntico de PBS.

As metástases de células tumorais MDA-MB-231-Luc+ foram identificadas medindo a actividade de luciferase em extractos de tecidos de nódulos linfáticos e pulmões, como descrito no Exemplo 31 acima. Para avaliar a incidência de metástase, extractos que tinham um sinal de luminescência de 500 unidades de luz acima do fundo (aproximadamente 100 unidades de luz) foram classificados como positivos. Este valor foi escolhido porque representou o sinal mínimo que podia ser reproduutivelmente detectado acima do fundo em tecidos em que metástases foram confirmadas independentemente por detecção imuno-histoquímica de células humanas. Os resultados líquidos

foram expressos como unidades de luz relativas (RLU) normalizadas por mg de proteína total do lisado, e estão apresentados na Figura 17A (metástase linfática) e na Figura 17B (metástase pulmonar).

Consistentemente com o efeito antitumoral significativamente melhorado, o efeito antimetastático foi também drasticamente melhorado pela combinação nab-paclitaxel/bevacizumab em tumores grandes bem estabelecidos. Embora cada um de bevacizumab ou nab-paclitaxel sozinhos tenham falhado na prevenção de metástase para nódulos linfáticos proximais e contralaterais e pulmões, as metástases linfáticas e pulmonares foram completamente eliminadas pela terapia de combinação (Figura 6 e Tabela 3), medido tanto pela carga metastática como pela incidência.

Estes resultados indicam que a terapia de combinação com Abraxane® (30 mg/kg) e Avastin® (4 mg/kg) suprime eficazmente tanto a metástase linfática como pulmonar em ratinhos portadores de tumores derivados de MDA-MB-231-Luc+, notavelmente, a combinação Abraxane®/Avastin® suprimiu significativamente a metástase pulmonar, em contraste com o tratamento com Abraxane® (30 mg/kg) ou Avastin® (4 mg/kg) sozinhos. Assim, a terapia de combinação com Abraxane® e Avastin® pode ser particularmente benéfica para a prevenção de recidiva de tumores resultante de angiogénese reacional, e para a supressão de metástase tanto linfática como pulmonar. Adicionalmente, a eficácia antitumoral melhorada e o melhor perfil de segurança do Abraxane® (*nab*-paclitaxel) relativamente ao paclitaxel à base de solvente convencional (Taxol®) tornam-no um candidato mais promissor para terapia de combinação. Mais surpreendentemente e encorajante, a combinação de Abraxane®/ Avastin® foi ainda altamente eficaz contra tumores grandes bem estabelecidos na medida da eliminação total tanto dos tumores principais como de metástases.

Lisboa, 2014-07-15

REIVINDICAÇÕES

1. Combinação de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano e uma proteína transportadora, e b) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, para utilização num método de tratamento de um cancro num indivíduo, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e até cerca de 10 mg/kg, em que o cancro é melanoma.

2. Combinação de: a) uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo nanopartículas compreendendo taxano e uma proteína transportadora, e b) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-VEGF, para utilização num método de inibição da metástase tumoral num indivíduo, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 45 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> e a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é superior a 1 mg/kg e até cerca de 10 mg/kg.

3. Combinação para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a metástase tumoral é metástase para os nódulos linfáticos, ou para o pulmão, ou metástase de cancro da mama.

4. Combinação para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que pelo menos cerca de 40% ou pelo menos 80% da metástase é inibida.

5. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a quantidade eficaz do anticorpo anti-VEGF é de cerca de 6 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, ou cerca de 10 mg/kg.

6. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a quantidade eficaz do taxano na composição de nanopartículas está entre cerca de 80 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 150 mg/m<sup>2</sup> de taxano na composição de nanopartículas, ou em que a quantidade eficaz do taxano na

composição de nanopartículas está entre cerca de 200 mg/m<sup>2</sup> e cerca de 350 mg/m<sup>2</sup> de taxano na composição de nanopartículas.

7. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados sequencialmente ao indivíduo.

8. Combinação para a utilização da reivindicação 1, em que a composição de nanopartículas é administrada durante pelo menos um ciclo antes da administração do anticorpo anti-VEGF.

9. Combinação para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a administração da composição de nanopartículas é seguida pela administração de um anticorpo anti-VEGF durante pelo menos cerca de 3 semanas.

10. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados concorrentemente.

11. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados simultaneamente.

12. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a composição de nanopartículas e o anticorpo anti-VEGF são administrados na mesma composição.

13. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o anticorpo anti-VEGF é bevacizumab.

14. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o taxano é paclitaxel.

15. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o diâmetro médio das nanopartículas na composição não é superior a cerca de 200 nm.

16. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a proteína transportadora é albumina.

17. Combinação para utilização de acordo com a reivindicação 16, em que a proteína transportadora é albumina humana ou albumina sérica humana.

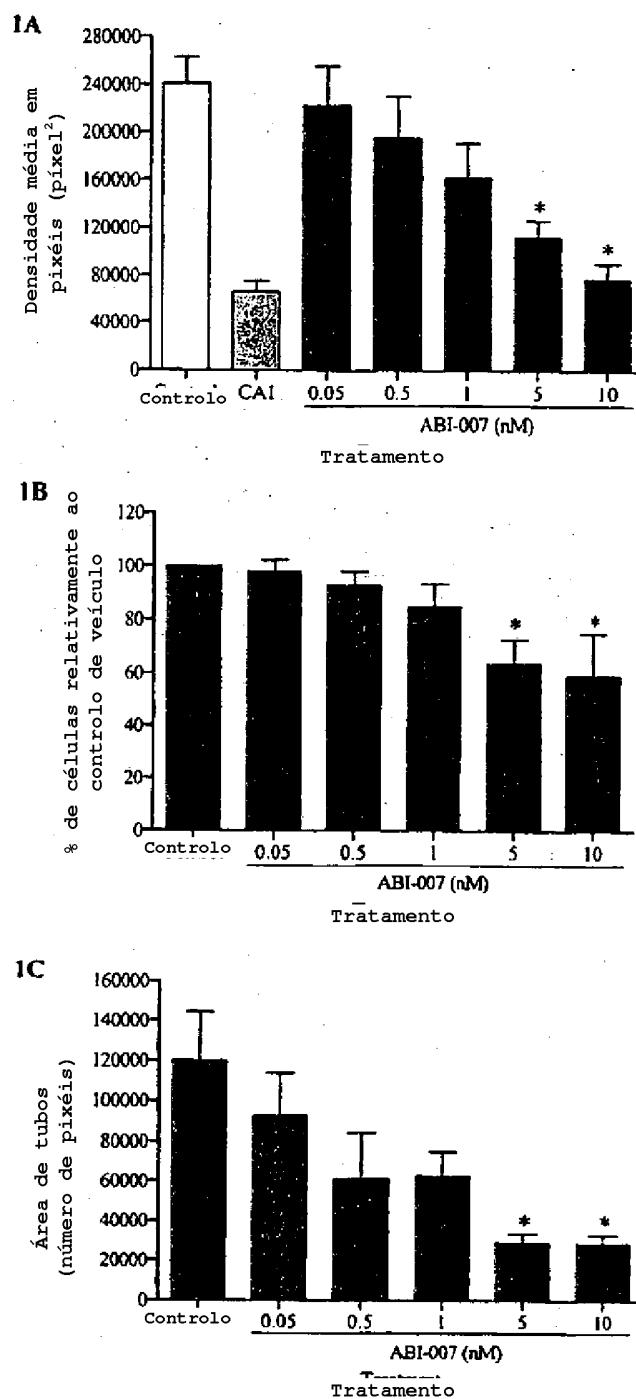
18. Combinação para utilização de acordo com a reivindicação 16 ou 17, em que a razão em peso entre a albumina e o taxano na composição de nanopartículas é inferior a cerca de 9:1.

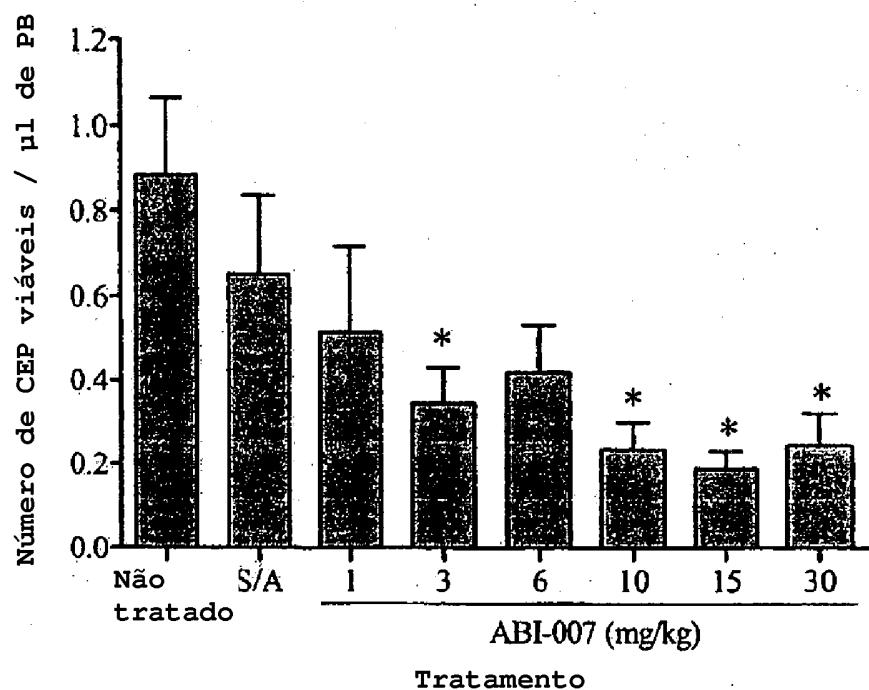
19. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a composição de nanopartículas está isenta de Cremophor.

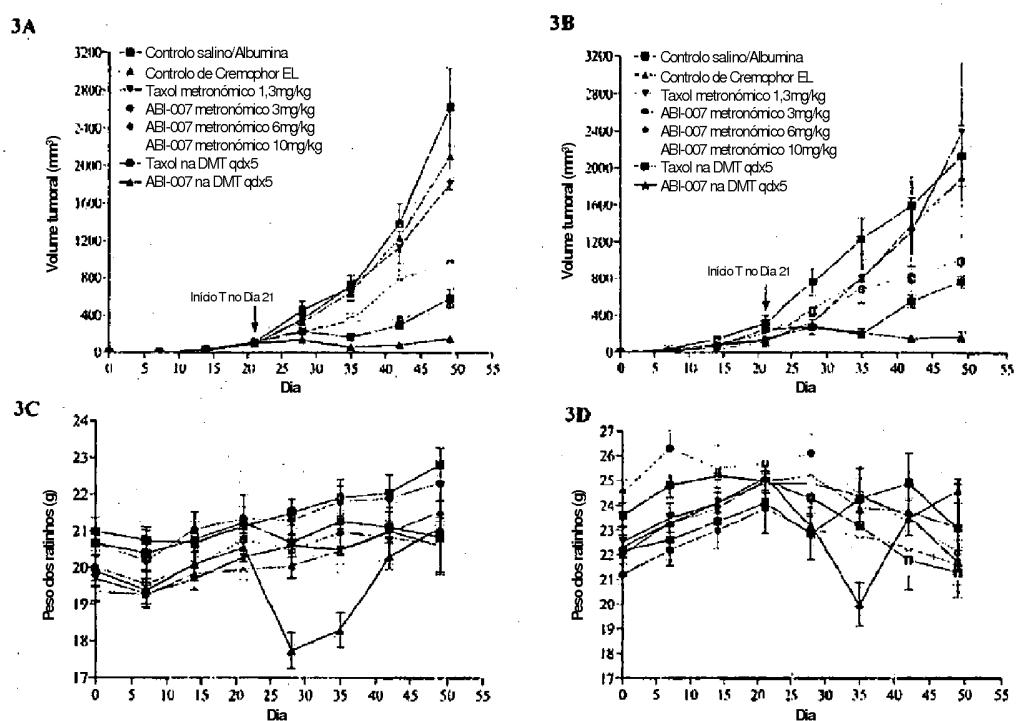
20. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, em que a composição de nanopartículas compreende taxano revestido com albumina.

21. Combinação para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o indivíduo é o ser humano.

Lisboa, 2014-07-15

**FIG. 1**

**FIG. 2**

**FIG. 3**

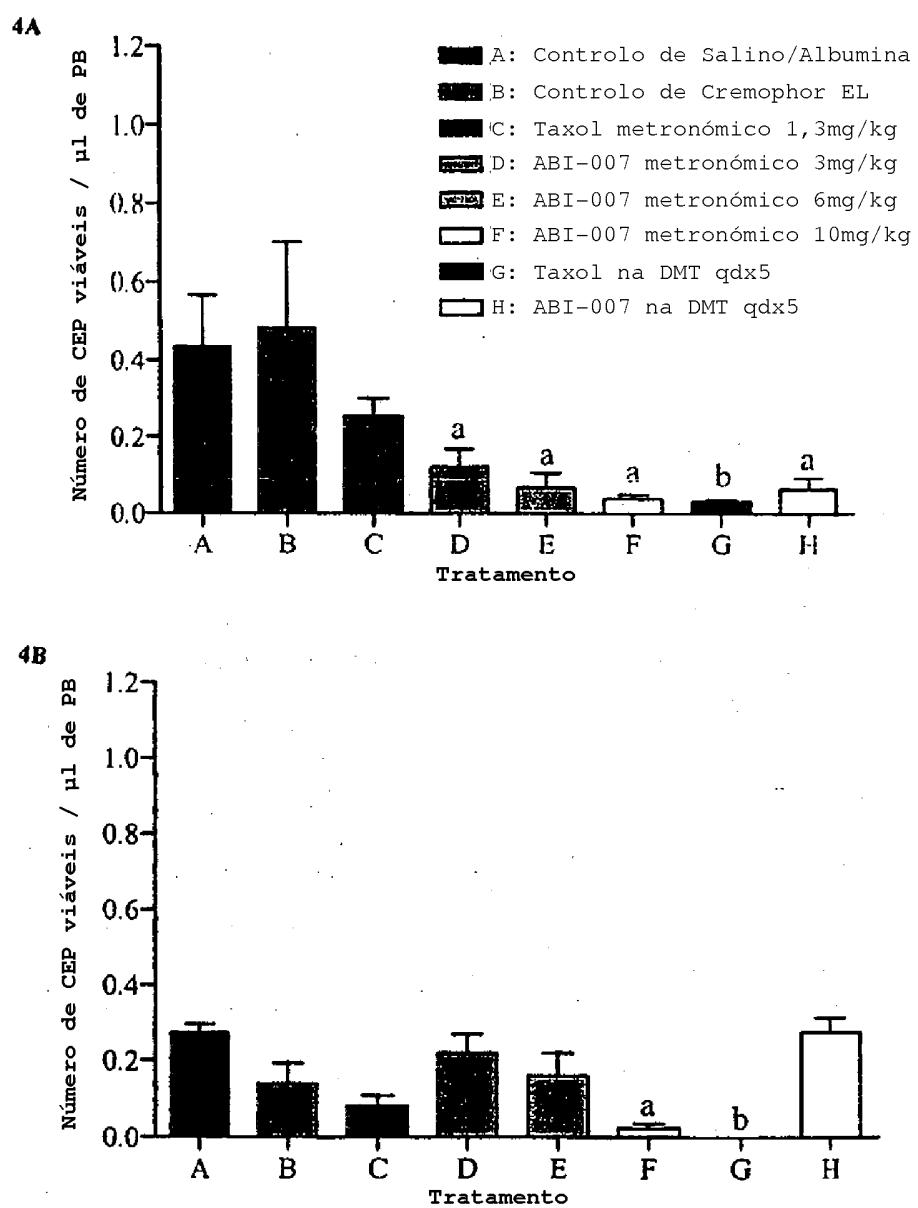
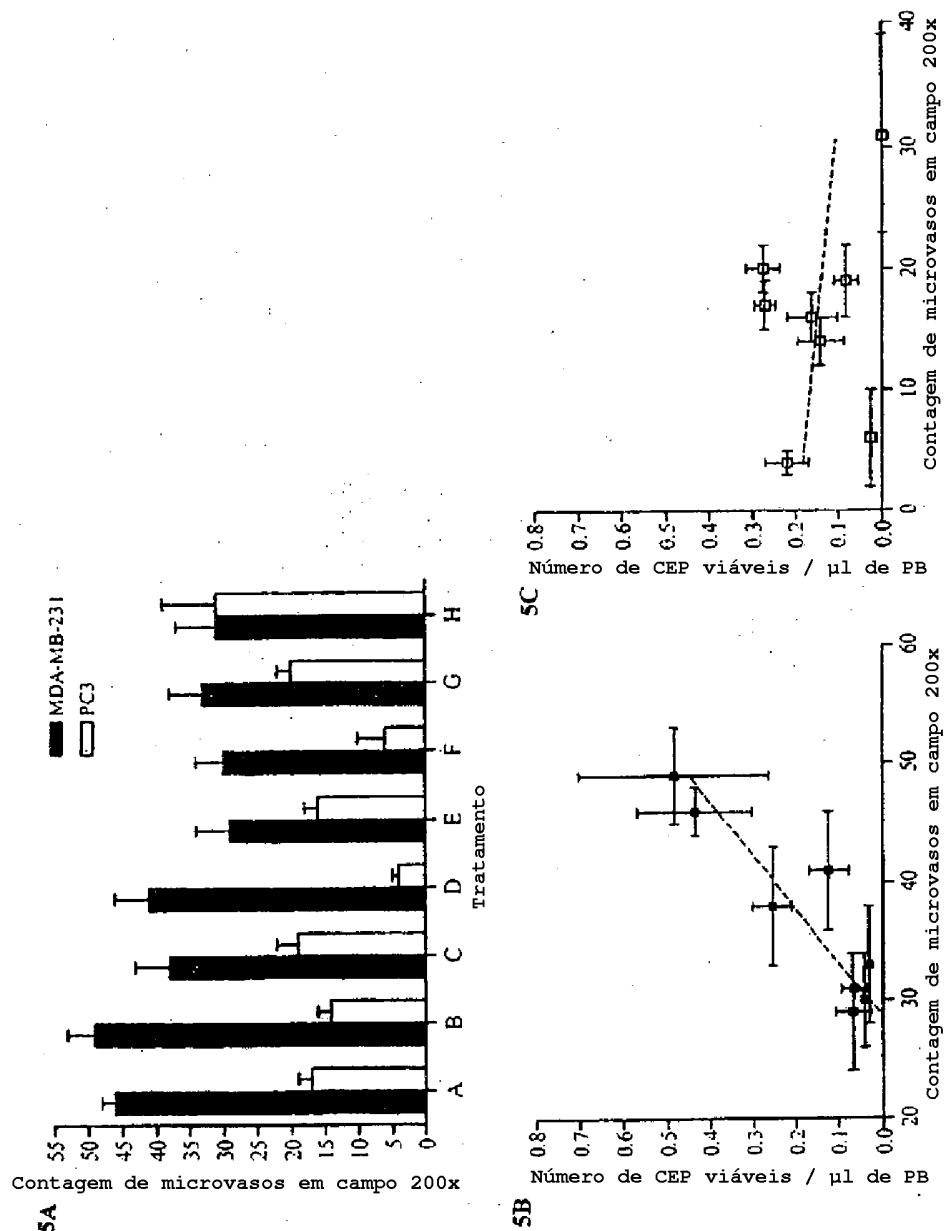
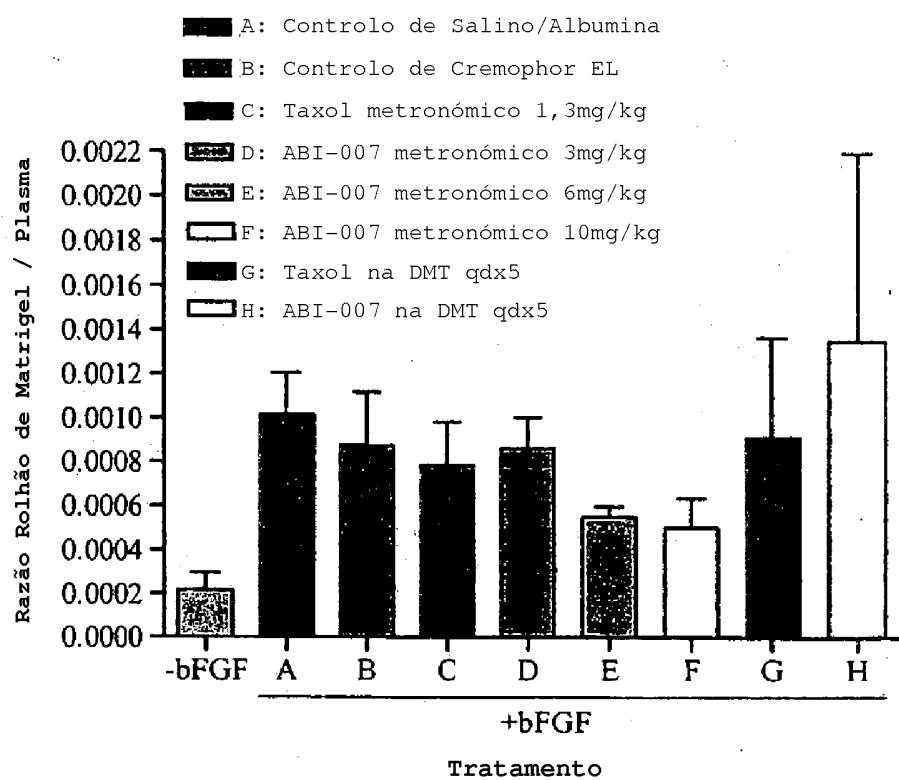
**FIG. 4**

FIG. 5



**FIG. 6**

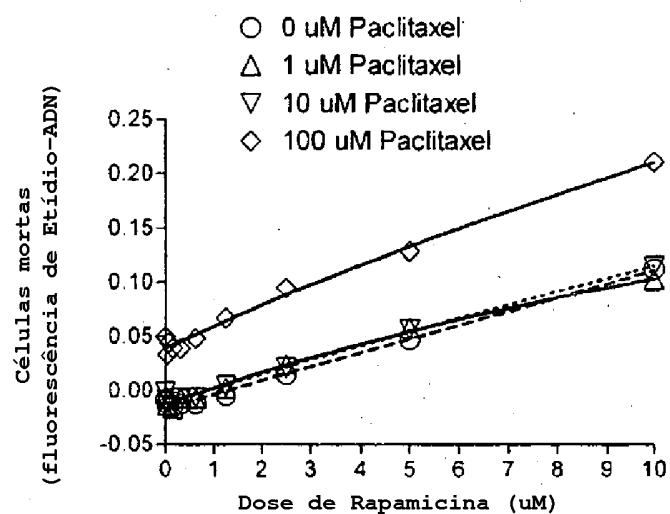
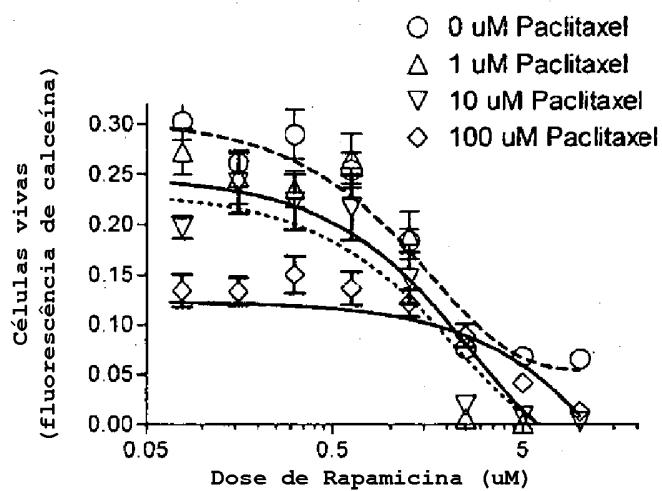
**FIG. 7****7A****7B**

FIG. 8

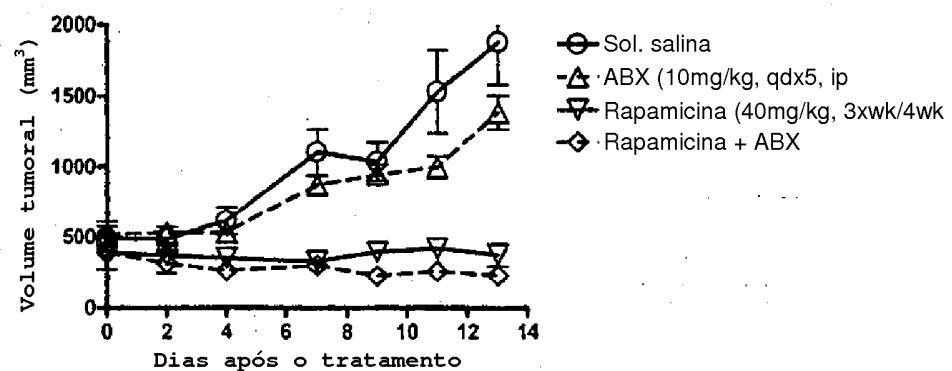
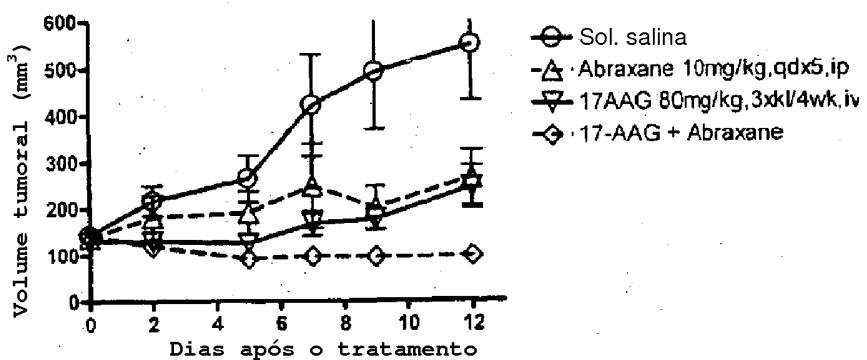
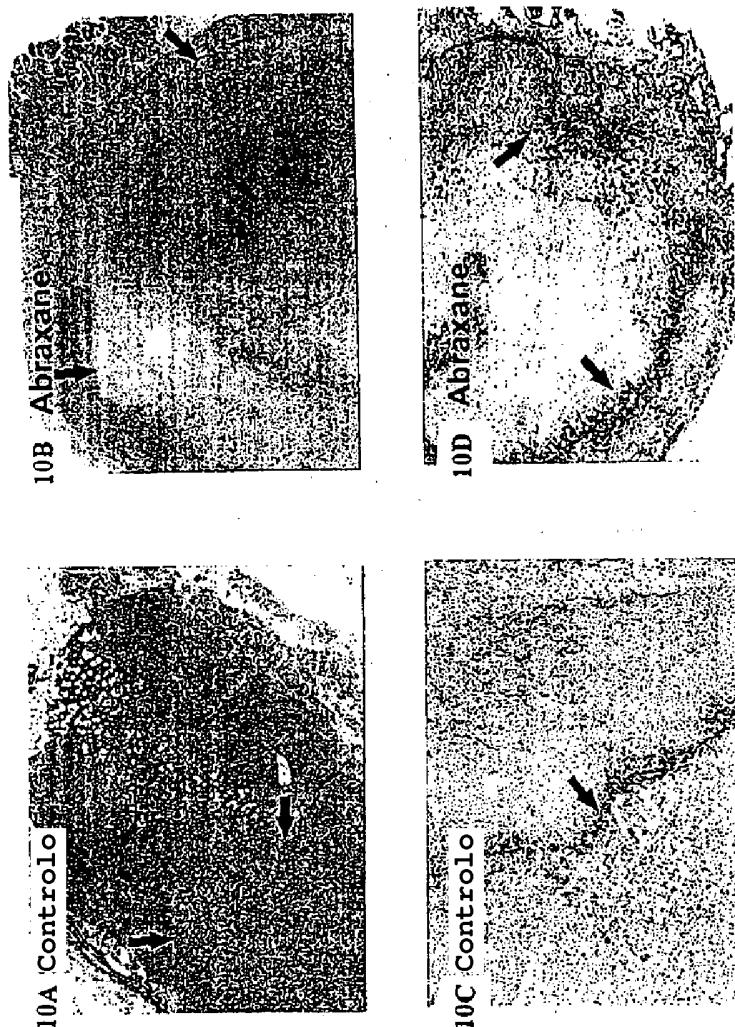


FIG. 9



**FIG. 10**



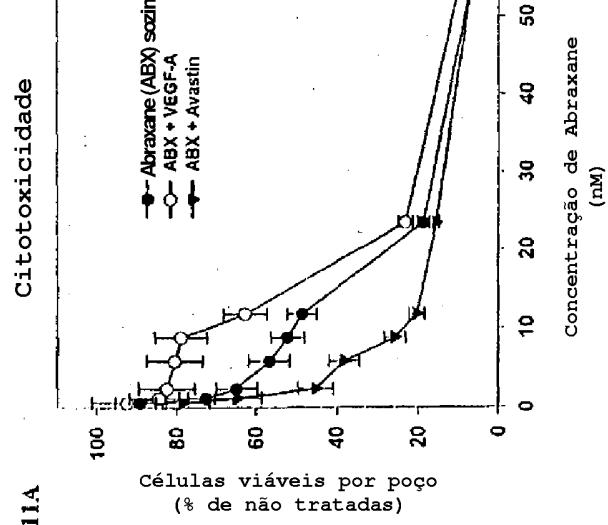
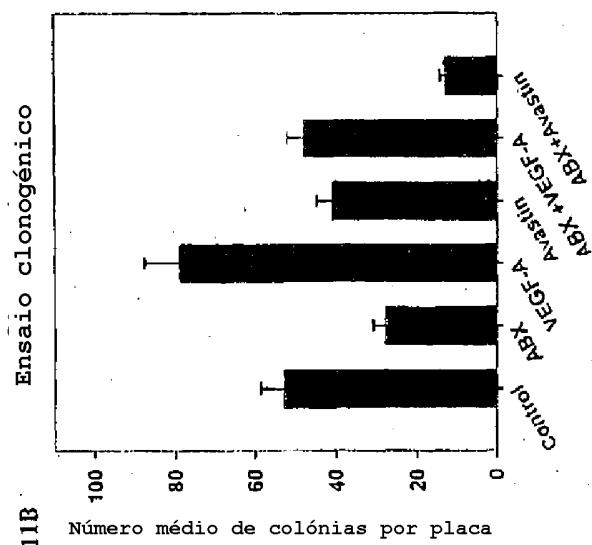
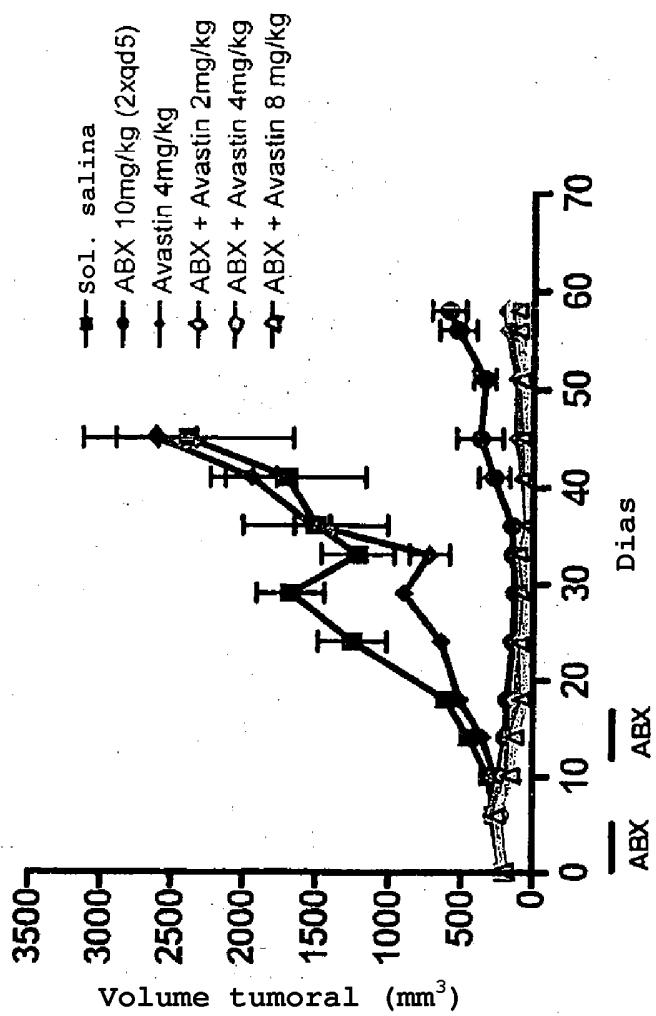
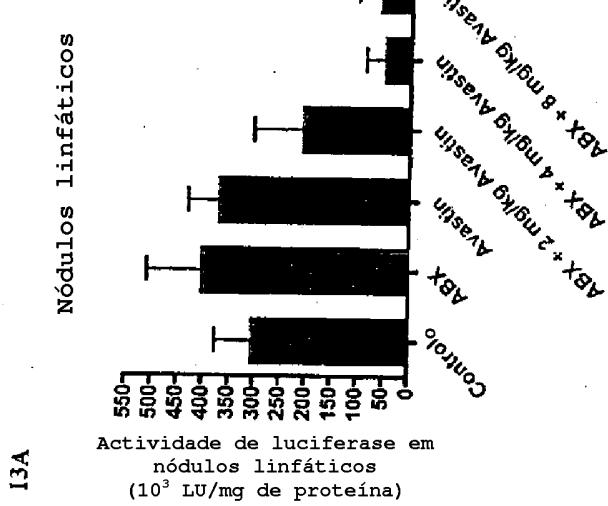
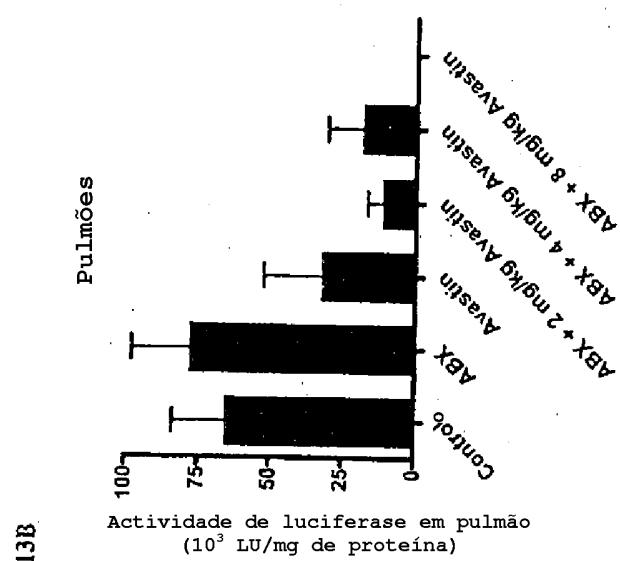
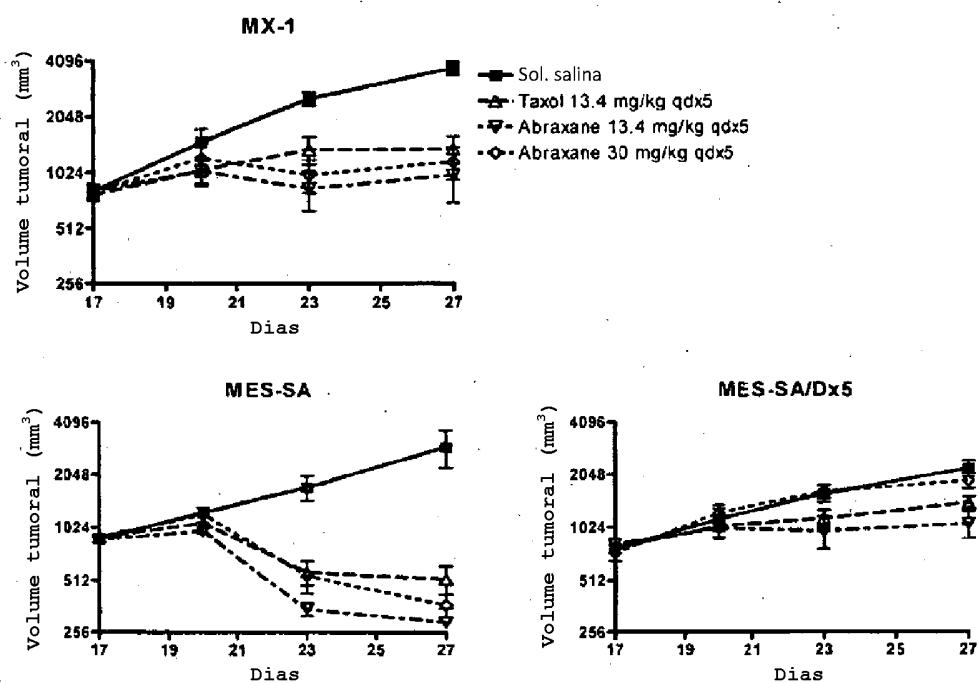
**FIG. 11**

FIG. 12



**FIG. 13**

**FIG. 14A**

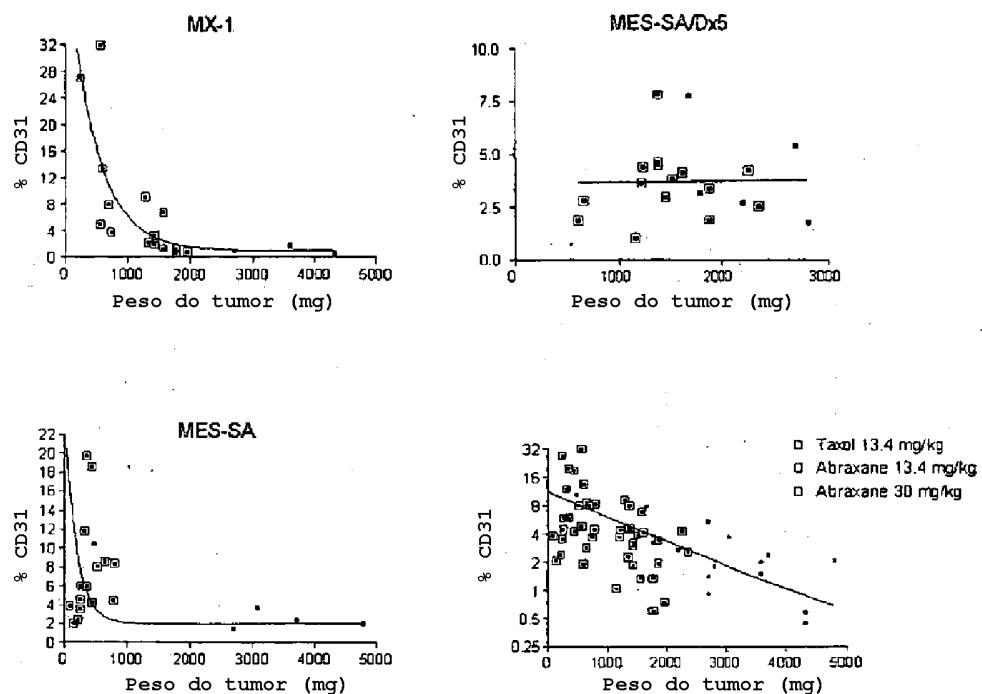
**FIG. 14B**

FIG. 15

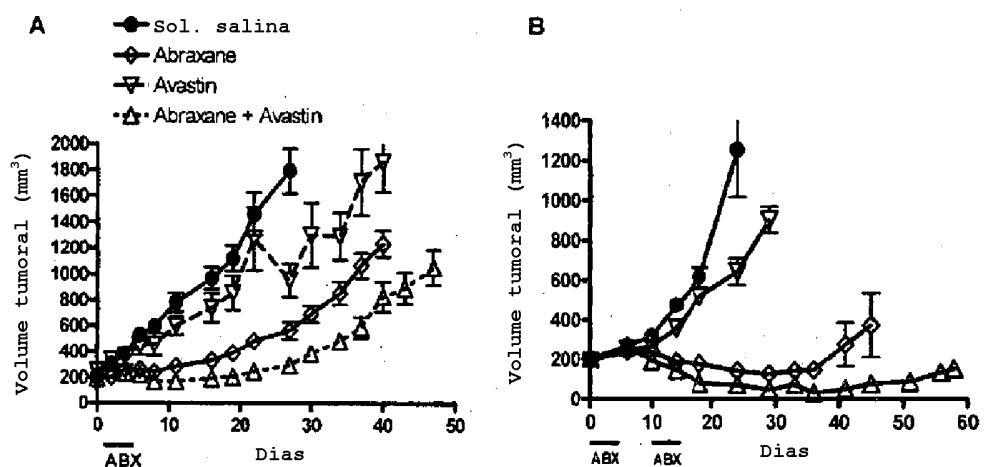


FIG. 16

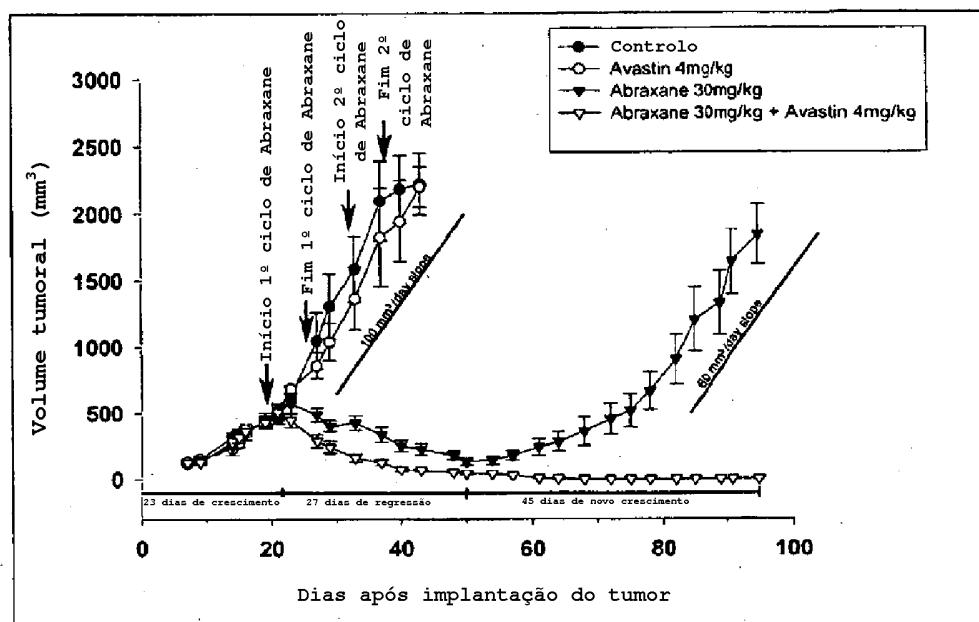
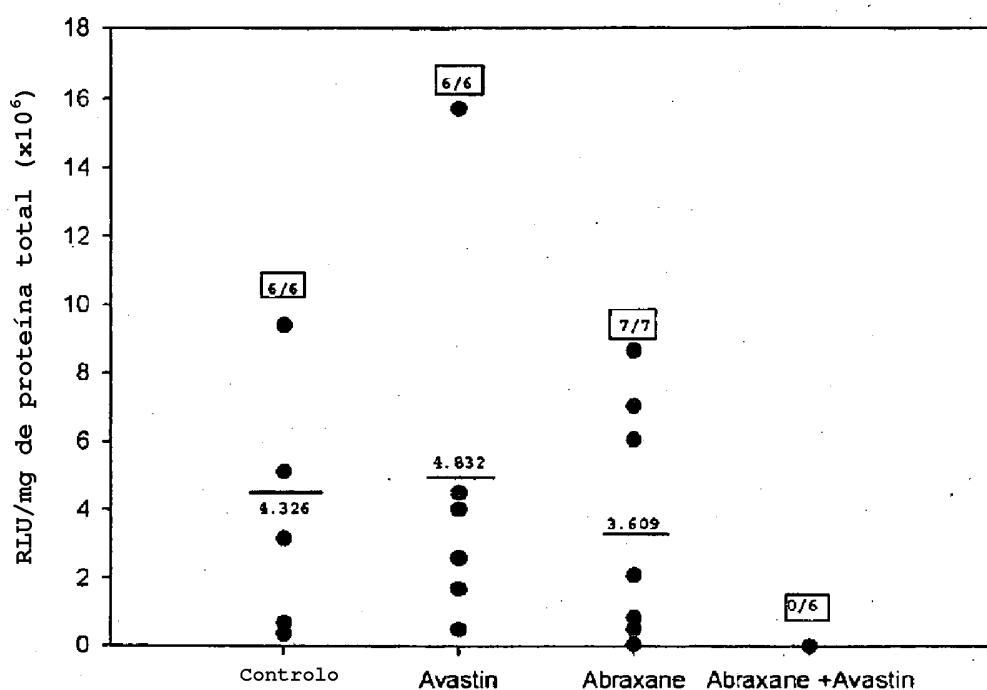


FIG. 17A



**FIG. 17B**