

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1997.11.04	(73) Titular(es): THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION 300 LONGWOOD AVENUE BOSTON, MASSACHUSETTS 02115	US
(30) Prioridade(s): 1996.11.05 US 28708 P 1997.11.03 US 963058		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.10.19	(72) Inventor(es): ROBERT J. D'AMATO	US
(45) Data e BPI da concessão: 2008.08.20 210/2008	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM TALIDOMIDA E DEXAMETASONA PARA O TRATAMENTO DE CANCRO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Composições que compreendem talidomida e dexametasona para o tratamento de cancro"

O presente invento compreende um grupo de compostos que inibem eficazmente a angiogénese. Mais especificamente, mostrou-se que a talidomida e vários compostos relacionados, tais como precursores, análogos, metabolitos e produtos de hidrólise de talidomida, inibem a angiogénese e tratam estados de doença resultantes de angiogénese. Adicionalmente, fármacos anti-inflamatórios, tais como esteróides e AINEs podem inibir doenças dependentes de angiogénese, quer sozinhos, quer em combinação com talidomida e compostos relacionados. De um modo importante, estes compostos podem ser administrados oralmente.

DESCRIÇÃO

"Composições que compreendem talidomida e dexametasona para o tratamento de cancro"

O presente invento refere-se a composições e medicamentos para utilização no tratamento de angiogénese indesejada num humano ou animal. Mais particularmente, o presente invento refere-se a composições e à sua utilização para prevenção de angiogénese indesejada, particularmente em doenças dependentes ou associadas a angiogénese, por administração de compostos tais como talidomida e compostos relacionados.

Antecedentes do invento

Como aqui utilizado, o termo "angiogénese" significa a geração de novos vasos sanguíneos num tecido ou órgão. Sob condições fisiológicas normais, humanos ou animais apenas sofrem angiogénese em situações restritas muito específicas. Por exemplo, a angiogénese é normalmente observada em cicatrização de feridas, desenvolvimento fetal e embrionário e formação do corpo lúteo, endométrio e placenta. O controlo da angiogénese é um sistema altamente regulado de estimuladores e inibidores angiogénicos. Tem-se constatado que o controlo da angiogénese está alterado em certos estados de doença e, em muitos casos, a lesão patológica associada com a doença está relacionada com angiogénese descontrolada.

Pensa-se que a angiogénese tanto controlada como não controlada prossegue de um modo similar. Células endoteliais e pericitos, rodeados por uma membrana basal, formam vasos sanguíneos capilares. A angiogénese inicia-se com a erosão da membrana basal por enzimas libertadas por células endoteliais e leucócitos. As células endoteliais, que revestem o lúmen de vasos sanguíneos, projectam-se depois através da membrana basal. Estimulantes angiogénicos induzem as células endoteliais a migrarem através da membrana basal corroída. As células migrantes formam um "rebento" para fora do vaso sanguíneo de origem, onde as células endoteliais sofrem mitose e proliferam. Os rebentos endoteliais combinam-se uns com os outros para formar espirais capilares, criando o novo vaso sanguíneo. No estado de doença, a prevenção de angiogénese poderia evitar a lesão causada pela invasão do novo sistema microvascular.

A angiogénese desregulada, persistente, ocorre numa multiplicidade de estados de doença, metástases de tumores e crescimento anormal por células endoteliais, e suporta a lesão patológica observada nestas condições. Os diversos estados patológicos criados devido a angiogénese desregulada têm sido agrupados como doenças dependentes de angiogénese ou doenças associadas a angiogénese. Terapias dirigidas ao controlo dos processos angiogénicos poderão conduzir à revogação ou mitigação destas doenças.

Um exemplo de uma doença mediada por angiogénese é a doença neovascular ocular. Esta doença é caracterizada por invasão de novos vasos sanguíneos para o interior das estruturas do olho tais como a retina ou a córnea. É a causa mais comum de cegueira e está envolvida em aproximadamente vinte doenças do olho. Em degeneração macular relacionada com a idade, os problemas visuais associados são causados por um crescimento para o interior de capilares coroidianos, através de defeitos na membrana de Bruch, com proliferação de tecido fibrovascular sob o epitélio do pigmento retiniano. A lesão angiogénica está também associada com retinopatia diabética, retinopatia da prematuridade, rejeição de transplante corneal, glaucoma neovascular e fibroplasia retrolental. Outras doenças associadas com neovascularização corneal incluem, mas não estão limitadas a, queratoconjuntivite epidémica, deficiência em Vitamina A, utilização excessiva de lentes de contacto, queratite atópica, queratite límbica superior, queratite seca de pterígio, síndrome de Sjogren, acne rosácea, plectenulose, sífilis, infecções por micobactéria, degeneração lipídica, queimaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecções por *Herpes simplex*, infecções por *Herpes zoster*, infecções por protozoários, síndrome de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneração marginal de Terrien, queratólise marginal, artrite reumatóide, lúpus sistémico, poliartrite, trauma, sarcoidose de Wegener, esclerite, doença de Steven's-Johnson, queratotomia radial, penfigóide e rejeição de transplante corneal.

Doenças associadas com neovascularização retiniana/coroideia incluem, mas não estão limitadas a, retinopatia diabética, macular degeneração, anemia falciforme, sarcóide, sífilis, *Pseudoxanthoma elasticum*, doença de Paget, oclusão de veia, oclusão de artéria, doença

obstrutiva da carótida, vitrite/uveíte crónica, infecções micobacterianas, doença de Lyme, lúpus eritematoso sistémico, retinopatia da prematuridade, doença de Eales, doença de Behcet, infecções causando uma retinite ou coroidite, histoplasmosse ocular presumida, doença de Best, miopia, picaduras ópticas, doença de Stargardt, pars planitis, descolamento retiniano crónico, síndromas de hiperviscosidade, toxoplasmosse, trauma e complicações pós-laser. Outras doenças incluem, mas não estão limitadas a, doenças associadas com rubeose (neovascularização do ângulo) e doenças causadas pela proliferação anormal de tecido fibrovascular ou fibroso incluindo todas as formas de vitreo-retinopatia proliferativa.

Outra doença em que se pensa que a angiogénese está envolvida é a artrite reumatóide. Os vasos sanguíneos no revestimento sinovial das articulações sofrem angiogénese. Para além de formarem novas redes vasculares, as células endoteliais libertam factores e espécies de oxigénio reactivo que conduzem a crescimento de *pannus* e a destruição da cartilagem. Os factores envolvidos em angiogénese podem contribuir activamente para, e ajudar a manter, o estado cronicamente inflamado de artrite reumatóide.

Factores associados com angiogénese podem também ter um papel em osteoartrite. A activação dos condrócitos por factores relacionados com a angiogénese contribui para a destruição da articulação. Numa fase posterior, os factores angiogénicos promoveriam a formação de osso novo. Uma intervenção terapêutica que prevenisse a destruição do osso poderia parar o progresso da doença e proporcionar alívio para pessoas sofrendo de artrite.

A inflamação crónica pode também envolver angiogénese patológica. Estados de doença tais como colite ulcerosa e doença de Crohn apresentam alterações histológicas com o crescimento para o interior de novos vasos sanguíneos para o interior de tecidos inflamados. A bartonelose, uma infecção bacteriana encontrada na América do Sul, pode resultar numa fase crónica que é caracterizada por proliferação de células endoteliais vasculares. Outro papel patológico associado com angiogénese é encontrado na aterosclerose. As placas formadas dentro do lúmen de vasos sanguíneos têm mostrado ter actividade estimulante angiogénica.

Uma das doenças angiogénicas mais frequentes da infância é o hemangioma. Em muitos casos, os tumores são benignos e regridem sem intervenção. Em casos mais graves, os tumores evoluem para grandes formas cavernosas e infiltrativas e criam complicações clínicas. Formas sistémicas de hemangiomas, as hemangiomatoses, têm uma taxa de mortalidade elevada. Existem hemangiomas resistentes a terapia que não podem ser tratados com as terapêuticas actualmente em utilização.

A angiogénese é também responsável por lesões encontradas em doenças hereditárias tais como doença de Osler-Weber-Rendu, ou telangiectasia hemorrágica hereditária. Esta é uma doença hereditária caracterizada por múltiplos pequenos angiomas, tumores de sangue e vasos linfáticos. Os angiomas são encontrados na pele e membranas mucosas, frequentemente acompanhadas por epistaxis (hemorragia nasal) ou hemorragia gastrointestinal e por vezes com fístula arteriovenosa pulmonar ou hepática.

A angiogénese é proeminente na formação de tumores sólidos e em metástases. Têm sido encontrados factores angiogénicos associados com vários tumores sólidos rabdomiossarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma e osteossarcoma. Um tumor não pode expandir-se sem um fornecimento de sangue para proporcionar nutrientes e remover os resíduos celulares. Os tumores nos quais a angiogénese é importante incluem tumores sólidos e tumores benignos, tais como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma e granulomas piogénicos. A prevenção de angiogénese podia parar o crescimento destes tumores e a lesão resultante para o animal devida à presença do tumor.

Será de notar que a angiogénese tem sido associada a tumores do sangue tais como leucemias, qualquer de várias doenças neoplásicas agudas ou crónicas da medula óssea nas quais ocorre a proliferação sem limitações de glóbulos brancos, usualmente acompanhada de anemia, coagulação sanguínea comprometida e aumento dos nódulos linfáticos, fígado e baço. Crê-se que a angiogénese desempenha um papel nas anomalias da medula óssea que dão origem a tumores do tipo leucemia.

A angiogénese é importante em duas etapas da metástase de tumores. A primeira etapa, quando a estimulação de angiogénese é importante, é a vascularização do tumor que permite às células de tumor entrar na corrente sanguínea e circular através do corpo. Após as células de tumor terem deixado o local primário, e se terem estabelecido no local de metástase secundário, a angiogénese tem de ocorrer antes do novo tumor poder crescer e expandir-se. Deste modo, a prevenção de angiogénese poderia conduzir à prevenção de metástases de tumores e possivelmente conter o crescimento neoplásico no local primário.

O conhecimento do papel da angiogénese na manutenção e metástase de tumores tem conduzido a um indicador prognóstico para o cancro da mama. Determinou-se a quantidade de neovascularização encontrada no tumor primário por contagem da densidade de microvasos na área da neovascularização mais intensa no carcinoma da mama invasivo. Constatou-se que um nível elevado de densidade de microvasos estava correlacionado com a recorrência do tumor. O controlo de angiogénese por meios terapêuticos poderia conduzir possivelmente à cessação da recorrência dos tumores.

A angiogénese está também envolvida em processos fisiológicos normais tais como reprodução e cicatrização de feridas. A angiogénese é um passo importante na ovulação e também na implantação da blástula após fertilização. A prevenção de angiogénese poderia ser utilizada para induzir amenorreia, para bloquear a ovulação ou para prevenir a implantação pela blástula.

Na cicatrização de feridas, a reparação excessiva ou fibroplasia pode ser um efeito colateral prejudicial de procedimentos cirúrgicos e pode ser causada ou exacerbada por angiogénese. As adesões são uma complicação frequente da cirurgia e conduzem a problemas tais como obstrução do intestino delgado.

Têm sido utilizados vários tipos de compostos para prevenir a angiogénese. Taylor *et al.* utilizaram protamina para inibir a angiogénese, ver Taylor *et al.*, *Nature* 297: 307 (1982). A toxicidade de protamina limita a sua utilização prática como uma terapêutica. Folkman *et al.* revelaram a utilização de heparina e de esteróides para controlar a

angiogénese. Ver Folkman *et al.*, *Science* 221: 719 (1983) e Patentes U.S. N.º 5001116 e 4994443. Esteróides, tais como tetra-hidroocortisol, que não possuem actividade mineral e glucocorticóide, têm mostrado ser inibidores angiogénicos.

Outros factores encontrados endogenamente em animais, tais como uma glicoproteína de 4 kDa a partir de humor vítreo de bovino e um factor derivado de cartilagem, têm sido utilizados para inibir a angiogénese. Factores celulares tais como interferão inibem a angiogénese. Por exemplo, o interferão α ou o interferão β humano têm mostrado inibir a angiogénese induzida por tumor em derme de ratinho estimulada por células neoplásicas humanas. O interferão β é também um inibidor potente de angiogénese induzida por células de baço alogeneicas. Ver Sidky *et al.*, *Cancer Research* 47: 5155-5161 (1987). Foi noticiado que interferão α recombinante de humano (alfa/A) foi utilizado com sucesso no tratamento de hemangiomatose pulmonar, uma doença induzida por angiogénese. Ver White *et al.*, *New England J. Med.* 320: 1197-1200 (1989).

Outros agentes que têm sido utilizados para inibir a angiogénese incluem éteres de ácido ascórbico e compostos relacionados. Ver Kokai Tokkyo Koho Japonesa N.º 58-131978. O polissacárido sulfatado DS 4152 mostra também inibição angiogénica. Ver Kokai Tokkyo Koho Japonesa N.º 63-119500. Um produto fúngico, fumagilina, é um agente angiostático potente *in vitro*. O composto é tóxico *in vivo*, mas um derivado sintético, AGM 12470, tem sido utilizado *in vivo* para tratar artrite de colagénio II. A fumagilina e derivados O-substituídos de fumagilina são revelados nas Publicações EPO N.ºs 0325199A2 e 0357061A1.

O Pedido PCT N.º WO 92/14455 de Kaplan *et al.* é dirigido a um método para controlo da concentração anormal de TNF- α por administração de talidomida ou de derivados de talidomida a um paciente com concentrações tóxicas de TNF- α .

Os compostos anteriores são agentes terapêuticos tópicos ou injectáveis. Deste modo, existem inconvenientes à sua utilização como um inibidor angiogénico geral e não possuem a potência adequada. Por exemplo, na prevenção de cicatrização de feridas excessiva, a cirurgia em órgãos internos do corpo envolve incisões em várias estruturas contidas no interior das cavidades corporais. Estes ferimentos não estão

acessíveis a aplicações locais de inibidores angiogénicos. Sistemas de entrega local envolvem também pensos frequentes que não são práticos para ferimentos internos, e aumentam o risco de infecção ou lesão no tecido de granulação delicado para ferimentos superficiais.

Assim, são necessários um método e uma composição que sejam capazes de inibir a angiogénese e que sejam facilmente administrados. Um método de tratamento simples e eficaz seria através da via oral. Se um inibidor angiogénico pudesse ser dado por uma via oral, os muitos tipos de doenças acima discutidas, e outras patologias dependentes de angiogénese, poderiam ser tratadas facilmente. A dosagem óptima poderia ser distribuída numa forma que o paciente pudesse auto-administrar.

De acordo com o presente invento, são proporcionadas composições e medicamentos que podem ser utilizados para tratar angiogénese indesejada. Estas composições são facilmente administradas por vias diferentes, incluindo oralmente, e podem ser dadas em dosagens que são seguras e proporcionam inibição angiogénica em locais internos. O presente invento proporciona composições e medicamentos para utilização no tratamento de doenças de mamífero mediadas por angiogénese indesejada e descontrolada. Estas composições compreendem um composto antiangiogénico numa dosagem suficiente para tratar cancro.

O presente invento inclui também compostos inibidores de angiogénese que contêm um grupo epóxido. Estes compostos inibidores de angiogénese podem ser administrados a um humano ou animal sozinho ou com compostos inibidores de epóxido-hidrolase.

O presente invento inclui também composições compreendendo um composto antiangiogénese e um composto anti-inflamatório. O composto anti-inflamatório pode ser um composto anti-inflamatório quer esteróide quer não esteróide. Preferem-se os compostos anti-inflamatórios não esteróides, denominados por AINEs.

As composições e medicamentos de acordo com o presente invento podem ser utilizados para tratamento de certas doenças oculares neovasculares tais como degeneração macular.

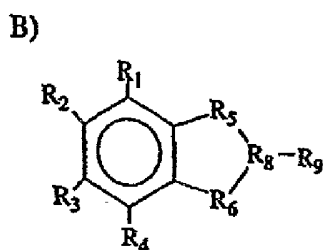
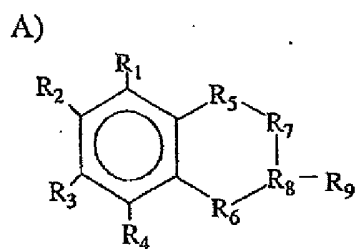
Os compostos que são contemplados como parte do presente invento preferivelmente podem ser dados oralmente ao paciente e desse modo parar a progressão da doença. Outras doenças que podem ser tratadas utilizando o presente invento são retinopatia diabética, glaucoma neovascular e fibroplasia retrolental.

Num primeiro aspecto do invento, é proporcionada a utilização de uma quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona para a fabricação de um medicamento para utilização num método de tratamento do cancro.

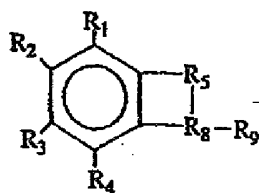
Num segundo aspecto do invento, é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo talidomida e dexametasona e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Concretizações preferidas do invento em qualquer dos seus vários aspectos são conforme a seguir descrito ou como definido nas reivindicações subsequentes.

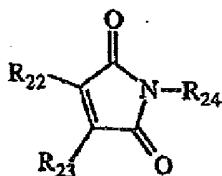
As Figuras 1 a 3 são uma listagem de compostos representativos do género representado pelas fórmulas gerais seguintes:



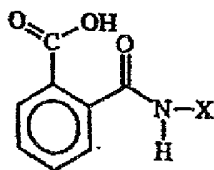
C)



A Figura 4 é uma listagem de compostos representativos do género representado pela fórmula geral seguinte:



A Figura 5 é uma listagem de compostos representativos do género representado pela fórmula geral seguinte:



A Figura 6 mostra o efeito de talidomida e EM12 na angiogénese num modelo de angiogénese de córnea de coelho.

A Figura 7 mostra o efeito de talidomida na área de vascularização corneal num modelo de angiogénese de córnea de coelho.

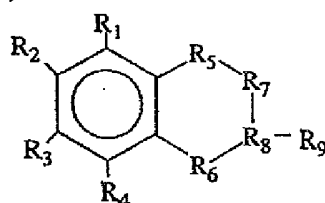
A Figura 8 mostra o efeito de talidomida, sulindac ou uma combinação dos dois na inibição do crescimento de tumor de carcinoma V2 em coelhos fêmea New Zealand White.

O presente invento inclui composições e medicamentos para o tratamento de doenças que são mediadas por angiogénese. Uma concretização do presente invento é a utilização de talidomida ou dos metabolitos de talidomida como aqui revelado para inibir angiogénese indesejada. O presente invento inclui também compostos que causam dismelia no feto em desenvolvimento e têm actividade antiangiogénica. O presente invento compreende a utilização destas composições

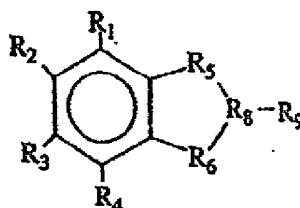
e medicamentos para utilização no tratamento de angiogénese indesejada num humano ou animal. Estas composições e medicamentos compreendem uma quantidade eficaz de um composto teratogénico que é antiangiogénico.

Compostos que podem ser utilizados de acordo com o presente invento incluem compostos incluídos nas fórmulas gerais seguintes. Exemplos de compostos que têm propriedades antiangiogénicas possuem uma das três fórmulas seguintes (A), (B) ou (C):

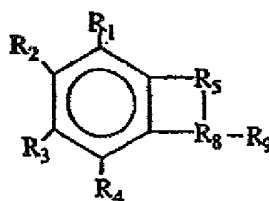
A)



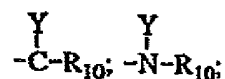
B)



C)

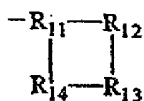


Nas fórmulas anteriores, A), B) e C), R_1 , R_2 , R_3 e R_4 podem ser seleccionados entre: -H; -OH; =O, alcanos, alcenos, alcinos de cadeia linear e ramificada; alcanos, alcenos e alcinos cíclicos; combinações de alcanos, alcenos e alcinos cíclicos e acíclicos; porções álcool, aldeído, cetona, ácidos carboxílicos, ésteres ou éter em combinação com porções acíclicas, cíclicas ou combinação de acíclicas/cíclicas; aza; amino; $-XO_n$ ou $-O-XO_n$, onde $X = N$ e $n = 2$; $X = S$ e $n = 2$ ou 3 ; ou $X = P$ e $n = 1-3$; e halogéneos; R_5 , R_6 , R_7 e R_8 são cada um seleccionados independentemente entre:

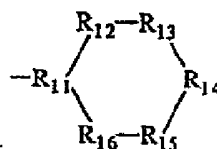


ou -O- onde Y é opcional e é o mesmo como definido acima para R₁; e R₁₀ é o mesmo como definido acima para R₁, ou quando Y está ausente, R₁₀ é =O; e R₉ é uma porção possuindo a fórmula D), E), F), G) ou H):

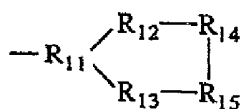
D)



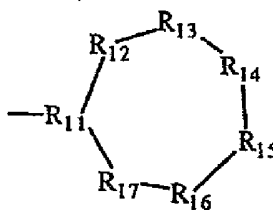
F)



E)

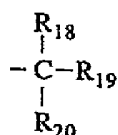


G)

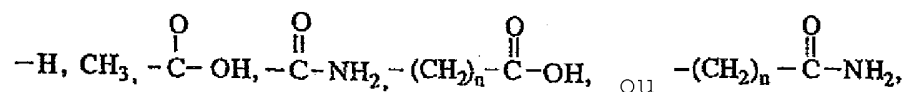


onde cada um de R₁₁ - R₁₇ é independentemente o mesmo como definido acima para R₅;

H)



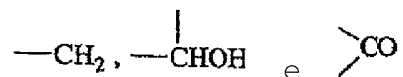
onde R₁₈, R₁₉ e R₂₀ são seleccionados independentemente entre



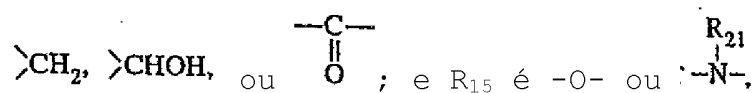
e n = 1 a 4.

Deste modo, o presente invento refere-se à utilização dos compostos anteriores para utilização na inibição da angiogénese num mamífero. Os compostos são administrados numa dosagem suficiente para inibir a angiogénese.

Em concretizações preferidas, o composto tem a fórmula B), onde R_5 e R_6 são seleccionados entre o grupo consistindo de:

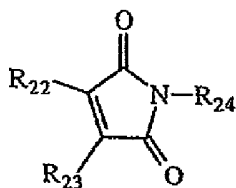


e R_9 tem a fórmula F) ou H); e R_{14} e R_{16} são seleccionados entre o grupo consistindo de:



onde R_{21} é -H, -CH₃ ou -OH. Compostos preferidos específicos de acordo com este aspecto do presente invento incluem talidomida, seus precursores, metabolitos e análogos. Análogos particulares incluem EM-12, ácido N-ftaloíl-DL-glutâmico (PGA) ou anidrido de N-ftaloíl-DL-glutamina. Exemplos de compostos que são membros deste género estão listados nas Figuras 1 a 3. Deve ser entendido que os compostos incluídos como parte do presente invento não estão limitados àqueles compostos apresentados nas Figuras 1 a 3 e incluem todos os outros compostos que são membros do género descrito pelas fórmulas gerais aqui apresentadas.

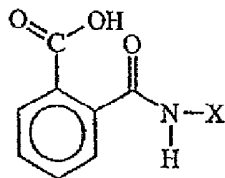
Os compostos da fórmula seguinte têm propriedades antiangiogénicas:



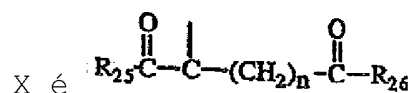
onde R_{22} e R_{23} são (independentemente), -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃ ou -CH₂-CH₃; e R_{24} é -H, -CH₃ ou -CH₂-CH₃.

O presente invento refere-se também à utilização dos compostos anteriores para utilização na inibição de angiogénese num mamífero. Os compostos são administrados numa dosagem suficiente para inibir a angiogénese. Exemplos de compostos específicos que são membros deste género estão listados na Figura 4.

Produtos de hidrólise de talidomida de inibição de angiogénese possuindo a fórmula geral podem ser utilizados na prática do presente invento:

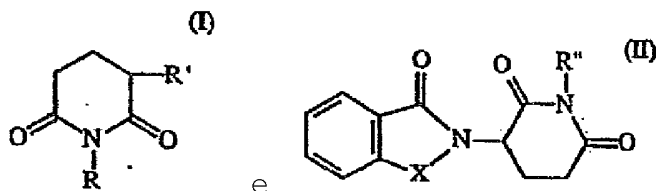


onde X é R_6 como definido acima, ou

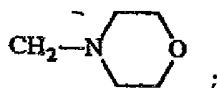


e R_{25} e R_{26} são, independentemente, -OH, -H ou NH_2 , e $n = 1$ a 4. Exemplos destes compostos são apresentados na Figura 5.

Compostos para inibição de angiogénese possuindo a fórmula geral seguinte podem ser utilizados na prática do presente invento:



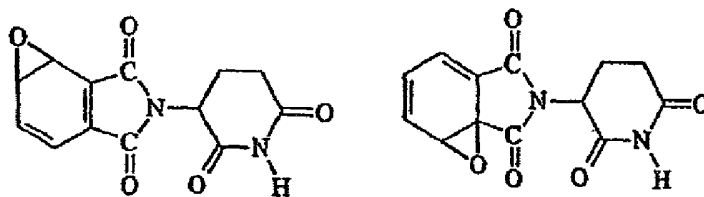
onde R é seleccionado entre o grupo consistindo de hidrogénio, radicais alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o radical fenilo e o radical benzilo; onde R' é seleccionado entre o grupo consistindo do radical ftalimido e do radical succinimido; onde X é CH_2 ou $C=O$; e onde R'' é H, $-CH_2CH_3$, $-C_6H_5$, $-CH_2C_6H_5$, $-CH_2CH=CH_2$ ou



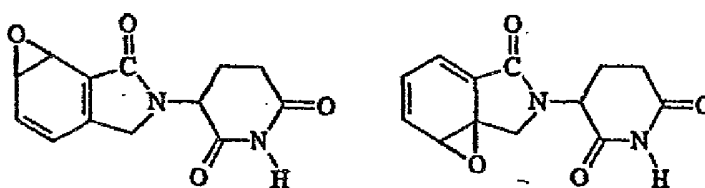
e produtos de hidrólise dos compostos onde R'' é H e o anel piperidino ou ambos o anel piperidino e o anel imido estão hidrolisados.

Outro conjunto de compostos que são considerados parte do presente invento são os epóxidos de talidomida, EM-12 e

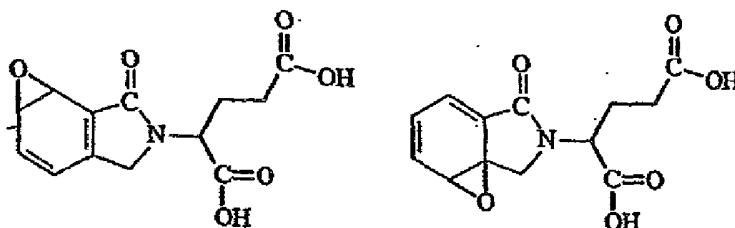
EM-138. Compostos de epóxido representativos são apresentados como se segue:



Epóxidos de talidomida



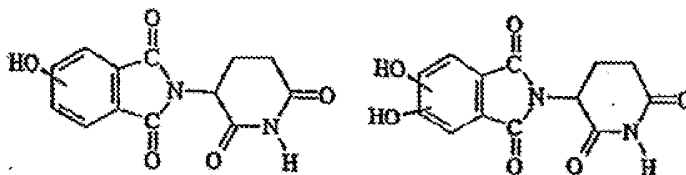
Epóxidos de EM 12

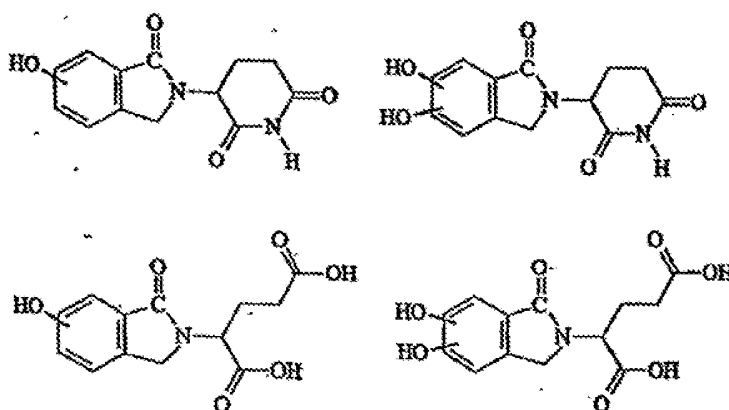


Epóxidos de EM 138

Deverá ser entendido que o epóxido pode estar ligado ao local 6,1 do anel de benzeno, ao local 1,2, ao local 2,3, ao local 3,4 ou ao local 4,5. Todos estes compostos são contemplados como parte do presente invento.

Os epóxidos da talidomida, EM-12 e EM-138 podem ser hidrolisados nos compostos seguintes:



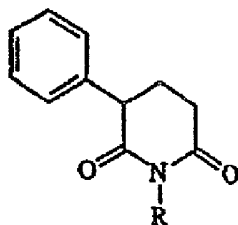


Deve ser entendido que o grupo hidroxilo pode estar nos carbonos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do anel de benzeno. Como parte do presente invento estão também contemplados compostos de di-hidroxilo onde os dois grupos hidroxilo estão localizados bis um em relação ao outro nos carbonos 1, 2, 3, 5 e 6 dos compostos acima. Os epóxidos, os produtos de hidrólise dos epóxidos, e os produtos de hidrólise da talidomida estão todos contemplados como parte do presente invento.

É conhecido que os epóxidos são hidrolisados por um grupo de enzimas conhecidas como epóxido-hidrolases. Existe uma classe de compostos que são inibidores de epóxido-hidrolase. Exemplos destes compostos são valpromida (2-propilpentanamida) e ácido valpróico (ácido 2-propilpentanóico). Porque os epóxidos são inibidores de angiogénese importantes, como parte do presente invento estão contempladas composições compreendendo quaisquer dos compostos inibidores de angiogénese aqui enumerados em combinação com inibidores de epóxido-hidrolase. Os inibidores de epóxido-hidrolase podem ser administrados a um humano ou animal em conjunto ou sequencialmente. O grupo epóxido parece ser um substituinte importante comum a vários inibidores de angiogénese. A utilização de inibidores de epóxido-hidrolase para potenciar a actividade de qualquer inibidor de angiogénese contendo um epóxido está contemplada como parte do presente invento. Por exemplo, os inibidores de epóxido-hidrolase podem ser administrados com os compostos antiangiogénese contendo epóxido seguintes: AGM 1470, Eponimycin, metabolitos microbianos de *Scolecobasidium arenarium* designados f/2015, fr/111142 e fr/18487. Ver Oikawa, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 81: 1070 (1971) e Otsuka, *J. Microbial. Biotech.*, Vol 1: 163 (1991).

O presente invento contempla também a utilização dos inibidores de angiogénese contendo epóxido com ou sem inibidores de epóxido-hidrolase em composições e na fabricação de um medicamento para utilização no tratamento de doenças mediadas por níveis elevados ou tóxicos de TNF- α . O TNF- α tem sido reconhecido como manifestando uma toxicidade dependente da dose. Se presente com níveis baixos durante um longo período de tempo, o TNF- α pode resultar em caquexia. A caquexia é uma perda de peso geral e definhamento que ocorre no decurso de algumas doenças crónicas tais como cancro, infecções oportunistas de SIDA, doenças inflamatórias, doenças parasitárias, tuberculose e terapia de IL-2 de dose elevada. Os inibidores de angiogénese contendo epóxido, com ou sem inibidores de epóxido-hidrolase, são também eficazes no tratamento de doenças tais como choque séptico, lepra e doença de enxerto vs. hospedeiro.

Outras concretizações estão incluídas no presente invento. Por exemplo, outros compostos causadores de dismelia podem ser utilizados de acordo com o presente invento, e.g. ácido 4-metilftálico, piridoxina, vasopressina, acetazolamida ou um composto possuindo a fórmula seguinte (onde R = H, -OH ou -CH₃):



Outros compostos que são teratógenos, tais como ácido valpróico (ácido 2-propilpentanóico), os retinóides, tais como ácido cis-retinóico, e rifampina podem também ser utilizados de acordo com o invento.

Em resumo, os compostos preferidos são talidomida, bem como análogos, produtos de hidrólise, metabolitos e precursores de talidomida que são teratogénicos, e, mais especificamente, que causam dismelia. Contudo, deve ser entendido que não é necessário que um composto tenha tanto actividade teratogénica como actividade de inibição de angiogénese para ser considerado parte do presente invento. Compostos causadores de dismelia podem ser identificados

pelos procedimentos gerais de Helm, *Arzneimittelforschung*, 31(i/6):941-949 (1981), em que crias de coelho são examinadas após exposição ao composto no útero. Os compostos podem ser comprados em geral, e.g., na Andrulis Pharmaceuticals, Beltsville, MD, ou sintetizados de acordo com procedimentos conhecidos. Deve ser entendido que os compostos do presente invento podem existir como enantiómeros e que a mistura racémica de enantiómeros ou os enantiómeros isolados são todos considerados como dentro do âmbito do presente invento.

Muitos dos compostos que são contemplados como parte do presente invento podem estar enriquecidos em enantiómeros opticamente activos dos compostos especificados acima. Especificamente, Blaschke noticiou que os enantiómeros S podem ser desproporcionadamente responsáveis pelo efeito de produção de dismelia destes compostos. Ver, em geral, Blaschke, *Arzneimittelforschung* 29: 1640-1642 (1979). Os artigos acima descritos descrevem em geral procedimentos para obter preparações opticamente activas dos compostos de interesse. Ver, e.g. Shealy et al., *Chem. Indus.* 1030 (1965); e Casini et al., *Farmaco Ed. Sci.* 19: 563 (1964).

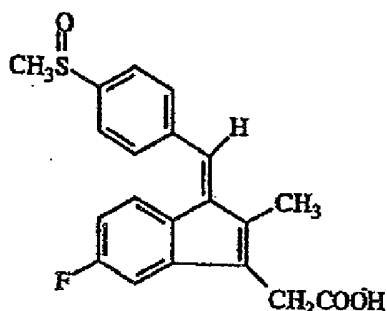
Para além de compostos anti-inflamatórios, quer sozinhos quer em combinação com outros compostos inibidores de angiogénese, tais como os acima descritos, podem ser utilizados em composições e na fabricação de um medicamento para utilização na inibição de angiogénese e no tratamento de doença dependente de angiogénese.

Estes compostos anti-inflamatórios podem ser fármacos anti-inflamatórios quer esteróides quer não esteróides (AINEs). Exemplos de esteróides que podem ser utilizados no invento incluem, mas não estão limitadas a, cortisona, cortisol, corticosterona, hidrocortisona, hidrocortisol, prednisona, prednisolona, dexametasona, beclometasona, betametasona, mometasona, furoato de mometasona, budesonide, acetonido de triancinolona e fluticasona. Esteróides preferidos são prednisona, hidrocortisona, cortisol, dexametasona, betametasona e beclometasona. Esteróides especialmente preferidos são hidrocortisona, dexametasona e betametasona.

Exemplos de AINEs que podem ser utilizados no invento incluem, mas não estão limitadas a, aspirina, acetaminofeno,

ibuprofeno, esculetina, fenidona, quercetina, cetoprofeno, ácido nordi-hidroguaiarético (NDGA), sulindac, sulindac sulfona, sulindac sulfureto, indometacina, NS-398 (um inibidor de ciclo-oxigenase-2), inibidores de ciclo-oxigenase-1, metil-heptilimidazole, furegrelato sódico, SKF525AHCL, inibidores de tromboxano, toradol, ECASA, salsalato, diflunisal, ácido mefenâmico, naproxeno, naproxeno sódico, floctafenina, meclofenamato, fenilbutazona, oxifenbutazona, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, ácido flufenâmico, flurbiprofeno, piroprofeno, tolmetina, apazona, fenbufeno, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, salicilato e tenoxicam. AINEs preferidos são sulindac, sulindac sulfona, sulindac sulfureto, indometacina, NS-398, metil-heptilimidazole, furegrelato sódico e SKF525AHCL. AINEs especialmente preferidos são indometacina e sulindac.

O sulindac, que inclui ácido (Z)-5-fluoro-2-metil-1-[[4-(metilsulfinil)fenil]metileno]-1H-indeno-3-acético ou ácido cis-5-fluoro-2-metil-1-[p-(metilsulfinil)benzilideno]indeno-3-acético, tem a estrutura seguinte:



Estes compostos podem ser utilizados para tratar doenças dependentes de angiogénese. Estes compostos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com outros compostos inibidores de angiogénese para tratar doenças dependentes de angiogénese, tais como cancro.

Os compostos acima descritos podem ser proporcionados como formulações farmacêuticamente aceitáveis utilizando métodos de formulação conhecidos dos técnicos competentes na matéria. Estas formulações podem ser administradas por vias padrão. Em geral, as combinações podem ser administradas pela via tópica, transdérmica, oral, rectal ou parentérica (e.g., intravenosa, subcutânea ou intramuscular). Adicionalmente, as combinações podem ser incorporadas em polímeros

biodegradáveis permitindo a libertação controlada do composto, os polímeros sendo implantados na vizinhança do local onde se deseja a entrega da droga, por exemplo, no local de um tumor. Os polímeros biodegradáveis e a sua utilização são descritos em detalhe, por exemplo, em Brem *et al.*, *J. Neurosurg.* 74: 441-446 (1991).

A dosagem do composto dependerá da condição que está a ser tratada, do composto particular e doutros factores clínicos, tais como o peso e condição do humano ou animal e da via de administração do composto. Deve ser entendido que o presente invento tem aplicação para utilização tanto humana como veterinária. Para administração oral a humanos, é geralmente suficiente uma dosagem entre aproximadamente 0,1 e 300 mg/kg/dia, preferivelmente entre aproximadamente 0,5 e 50 mg/kg/dia, e muito preferivelmente entre aproximadamente 1 e 10 mg/kg/dia.

As formulações incluem as adequadas para administração oral, rectal, oftálmica, (incluindo intravítrea ou intracameral) nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratraqueal e epidural). As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de unidade de dosagem e podem ser preparadas por técnicas farmacêuticas convencionais. Estas técnicas incluem o passo de colocar em associação o ingrediente activo e o(s) transportador(es) ou excipiente(s) farmacêutico(s). Em geral, as formulações são preparadas colocando uniformemente e intimamente em associação o ingrediente activo com transportadores líquidos ou transportadores sólidos finamente divididos ou ambos, e depois, se necessário, dando forma ao produto.

Formulações do presente invento adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades discretas tais como cápsulas, hóstias ou comprimidos, cada uma contendo uma quantidade predeterminada do ingrediente activo; como um pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou num líquido não aquoso; ou como uma emulsão líquida de óleo-em-água ou uma emulsão líquida de água-em-óleo ou como um bólus, etc.

Um comprimido pode ser preparado por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes

acessórios. Comprimidos prensados podem ser preparados por compressão, numa máquina adequada, do ingrediente activo numa forma de escoamento livre, tal como um pó ou grânulos, opcionalmente misturada com um ligante, lubrificante, diluente inerte, conservante, tensioactivo ou agente dispersante. Comprimidos moldados podem ser preparados por moldagem, numa máquina adequada, de uma mistura do composto em pó humedecido com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem ser opcionalmente revestidos ou entalhados e podem ser formulados de modo a proporcionar uma libertação lenta ou controlada do ingrediente activo aí contido.

Formulações adequadas para administração tópica na boca incluem pastilhas compreendendo os ingredientes numa base aromatizada, usualmente sacarose e goma-arábica ou goma adragante; pastilhas moles compreendendo o ingrediente activo numa base inerte tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e goma-arábica; e soluções para lavagem da boca compreendendo o ingrediente a ser administrado num transportador líquido adequado.

Formulações adequadas para administração tópica à pele podem ser apresentadas como pomadas, cremes, géis e pastas compreendendo o ingrediente a ser administrado num transportador farmacêutico aceitável. Um sistema de entrega tópica preferido é um sistema transdérmico contendo o ingrediente a ser administrado.

Formulações para administração rectal podem ser apresentadas como um supositório com uma base adequada compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau ou um salicilato.

Formulações adequadas para administração nasal, onde o transportador é um sólido, incluem um pó grosseiro possuindo um tamanho de partícula, por exemplo, na gama de 20 a 500 micron que é administrado como uma fungadela, i.e., por inalação rápida através da passagem nasal a partir de um recipiente do pó mantido na proximidade do nariz. Formulações adequadas, onde o transportador é um líquido, para administração, por exemplo, como uma pulverização nasal ou como gotas nasais, incluem soluções aquosas ou oleosas do ingrediente activo.

Formulações adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de pulverização contendo, para além do ingrediente activo, transportadores tais como são conhecidos na especialidade como apropriados.

Formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções para injeção estéreis aquosas e não aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacterioestáticos e solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do receptor pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas em recipientes unidose ou multidose, por exemplo, ampolas seladas e frascos para injectáveis, e podem ser armazenadas em condições congeladas-secas (liofilizadas) requerendo apenas a adição do transportador líquido estéril, por exemplo, água para injeção, imediatamente antes da utilização. Soluções e suspensões extemporâneas para injeção podem ser preparadas a partir de pós, grânulos e comprimidos estéreis do tipo anteriormente descrito.

Formulações de dosagem unitária preferidas são aquelas contendo uma dose ou unidade diária, subdose diária, como aqui acima enunciado, ou uma sua fracção apropriada, do ingrediente administrado.

Deverá ser entendido que, para além dos ingredientes particularmente acima mencionados, as formulações do presente invento podem incluir outros agentes convencionais na especialidade tendo em consideração o tipo de formulação em questão, por exemplo, aqueles adequados para administração oral podem incluir agentes aromatizantes.

Doenças associadas com neovascularização corneal que podem ser tratadas utilizando as composições e medicamentos do presente invento incluem mas não estão limitadas a, retinopatia diabética, retinopatia da prematuridade, rejeição de transplante da córnea, glaucoma neovascular e fibroplasia retrolental, queratoconjuntivite epidémica, deficiência em Vitamina A, utilização excessiva de lentes de contacto, queratite atópica, queratite límbica superior, queratite seca de pterígio, síndrome de Sjogren, acne rosácea, filectenulose, sífilis, infecções por micobactérias,

degeneração lipídica, queimaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecções por *Herpes simplex*, infecções por *Herpes zoster*, infecções por protozoários, síndrome de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneração marginal de Terrien, queratólise marginal, trauma, artrite reumatóide, lúpus sistémico, poliartrite, sarcoidose de Wegener, esclerite, doença de Stevens-Johnson, queratotomia radial, penfigóide e rejeição de transplante corneal.

Doenças associadas com neovascularização retiniana/coroideia que podem ser tratadas utilizando as composições e medicamentos de acordo com o presente invento incluem, mas não estão limitadas a, retinopatia diabética, macular degeneração, anemia falciforme, sarcóide, sífilis, *Pseudoxanthoma elasticum*, doença de Paget, oclusão de veia, oclusão de artéria, doença obstrutiva da carótida, vitrite/uveíte crónica, infecções micobacterianas, doença de Lyme, lúpus eritematoso sistémico, retinopatia da prematuridade, doença de Eales, doença de Behcet, infecções causando uma retinite ou coroidite, histoplasmose ocular presumida, doença de Best, miopia, picaduras ópticas, doença de Stargardt, pars planitis, descolamento retiniano crónico, síndromas de hiperviscosidade, toxoplasmose, trauma e complicações pós-laser. Outras doenças incluem, mas não estão limitadas a, doenças associadas com rubeose (neovascularização do ângulo) e doenças causadas pela proliferação anormal de tecido fibrovascular ou fibroso incluindo todas as formas de vitreo-retinopatia proliferativa, associadas ou não com a diabetes.

Doenças associadas com inflamação crónica podem ser tratadas pelas composições e métodos do presente invento. Doenças com sintomas de inflamação crónica incluem doenças inflamatórias do intestino tais como doença de Crohn e colite ulcerosa, psoríase, sarcoidose e artrite reumatóide. A angiogénese é um elemento que estas doenças inflamatórias crónicas têm em comum. A inflamação crónica depende da formação contínua de rebentos capilares para manter um influxo de células inflamatórias. O influxo e a presença das células inflamatórias produzem granulomas e, assim, mantêm o estado inflamatório crónico. A inibição de angiogénese pelas composições e métodos do presente invento impediria a formação dos granulomas e aliviaria a doença.

As composições e medicamentos do presente invento podem ser utilizados para tratar pacientes com doenças inflamatórias do intestino, doença de Crohn e colite ulcerosa. Tanto a doença de Crohn como a colite ulcerosa são caracterizadas por inflamação crónica e angiogénese em vários locais no tracto gastrointestinal. A doença de Crohn é caracterizada por inflamação granulomatosa crónica ao longo do tracto gastrointestinal consistindo de novos rebentos capilares rodeados por um cilindro de células inflamatórias. A prevenção de angiogénese pelas composições e métodos do presente invento inibe a formação dos rebentos e previne a formação de granulomas.

A doença de Crohn ocorre como uma doença inflamatória transmural crónica que muito usualmente afecta o íleo distal e o cólon mas pode também ocorrer em qualquer parte do tracto gastrointestinal desde a boca até ao ânus e área perianal. Os pacientes com doença de Crohn têm geralmente diarreia crónica associada com dor abdominal, febre, anorexia, perda de peso e dilatação abdominal. A colite ulcerosa é também uma doença crónica, não específica, inflamatória e ulcerativa, que surge na mucosa colónica e é caracterizada pela presença de diarreia com sangue.

As doenças inflamatórias do intestino exibem também manifestações extraintestinais tais como lesões da pele. Estas lesões são caracterizadas por inflamação e angiogénese e podem ocorrer em muitos locais para além do tracto gastrointestinal. As composições e medicamentos do presente invento são também capazes de tratar estas lesões por prevenção da angiogénese, reduzindo assim o influxo de células inflamatórias e a formação de lesão.

A sarcoidose é outra doença inflamatória crónica que é caracterizada como uma perturbação granulomatosa multi-sistémica. Os granulomas desta doença podem-se formar em qualquer local no corpo, e assim os sintomas dependem do local dos granulomas e de a doença estar ou não activa. Os granulomas são criados pelos rebentos capilares angiogénicos proporcionando um fornecimento constante de células inflamatórias.

As composições e medicamentos do presente invento podem também tratar as condições inflamatórias crónicas associadas

com a psoríase. A psoríase, uma doença de pele, é outra doença crónica e recorrente que é caracterizada por pápulas e placas de vários tamanhos. A prevenção da formação dos novos vasos sanguíneos necessários para manter as lesões características conduz ao alívio dos sintomas.

Outra doença que pode ser tratada utilizando as composições e medicamentos do presente invento é a artrite reumatóide. A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crónica caracterizada por inflamação não específica das articulações periféricas. Crê-se que os vasos sanguíneos no revestimento sinovial das articulações sofrem angiogénese. Para além de formarem novas redes vasculares, as células endoteliais libertam factores e espécies de oxigénio reactivo que conduzem a crescimento de *pannus* e a destruição de cartilagem. Os factores envolvidos em angiogénese podem contribuir activamente para, e ajudar a manter, o estado cronicamente inflamado de artrite reumatóide.

Outras doenças que podem ser tratadas de acordo com o presente invento são os hemangiomas, doença de Osler-Weber-Rendu, ou telangiectasia hemorrágica hereditária, tumores sólidos ou do sangue e síndrome de imunodeficiência adquirida.

As composições e medicamentos do presente invento incluem a utilização de compostos inibidores de angiogénese e de compostos anti-inflamatórios, tais como fármacos anti-inflamatórios esteróides ou não esteróides (AINEs). As composições e medicamentos do presente invento incluem a combinação de compostos inibidores de angiogénese, tais como talidomida ou análogos do tipo talidomida ou AMG-1470, EM-12 ou EM-138 com compostos anti-inflamatórios, tais como fármacos anti-inflamatórios esteróides ou não esteróides (AINEs). As composições e medicamentos do presente invento incluem também a utilização de compostos anti-inflamatórios sozinhos. Estas composições podem ser utilizadas para tratar doenças dependentes de angiogénese.

Por exemplo, constatou-se que a indometacina (5 mg/kg) inibe a angiogénese induzida por bFGF em 59% e a angiogénese induzida por VEGF em 61%. Similarmente, constatou-se que o sulindac (25 mg/kg) inibe a angiogénese induzida por bFGF em 50% e a angiogénese induzida por VEGF em 55%. O sulindac é

metabolizado *in vivo* em dois metabolitos: sulindac sulfureto e sulindac sulfona. O sulindac sulfureto inibe activamente a síntese de prostaglandina, enquanto o sulindac sulfona não; no entanto, constatou-se que ambos são inibidores de angiogénese. Constatou-se que o sulindac sulfureto inibe a neovascularização induzida por bFGF em 34%, e o sulindac sulfona exibiu uma inibição de 31%.

Têm-se constatado que outros AINEs inibem também a neovascularização associada a angiogénese. Por exemplo, o carbometil-heptilimidazole e o furegrelato sódico, ambos inibidores de tromboxano, inibem a neovascularização induzida por bFGF em 32% e 22%, respectivamente. Constatou-se que o inibidor de tromboxano, SKF525AHCL, que promove a produção de prostaglandina, inibe a neovascularização induzida por bFGF em 25%. O inibidor de ciclo-oxigenase-2 específico, NS-398 inibiu também a neovascularização induzida por bFGF em 25%.

Quando se combina sulindac com talidomida, existe um efeito aditivo na inibição de angiogénese. Quando se combina sulindac com outros compostos inibidores de angiogénese, tais como AMG 1470, EM-12 ou EM-138, existe um efeito aditivo na inibição de angiogénese. A angiogénese no olho, no ensaio descrito no Exemplo 2, é produzida pela presença de bFGF (factor de crescimento fibroblástico básico) e VEGF (factor de crescimento de células endoteliais vasculares). A inibição desta angiogénese foi mostrada com os AINEs, esteróides, talidomida ou a combinação de talidomida e um NSAID, sulindac.

AGENTE	DOSE	bFGF ¹	VEGF ²
Aspirina	100 mg/kg	8	–
Acetaminofeno	100 mg/kg	0	0
Ibuprofeno	20 mg/kg	7	11
Hidrocortisona	20 mg/kg	50	40
Sulindac	25 mg/kg	52	54
Talidomida	200 mg/kg	42	44
Talidomida + Sulindac	200 mg/kg (tal) + 25 mg/kg (sulindac)	65	74
AGM 1470	30 mg/kg qod	48	
AGM 1470 + Sulindac	30 mg/kg qod (AGM) + 25 mg/kg (sulindac)	70	

¹ % Inibição de angiogénese induzida por bFGF

² % Inibição de angiogénese induzida por VEGF

A inibição de VEGF em 74% demonstra o efeito aditivo quando se combinam talidomida e sulindac. Os resultados para hidro cortisona, sulindac, talidomida e talidomida + sulindac diferem significativamente dos resultados para os controles ($p < 0,0001$). Estudos com a composição compreendendo talidomida e sulindac no carcinoma V2 em coelhos demonstraram uma T/C (razão tratados para controlo) de 0,32 após 18 dias de tratamento oral com 200 mg/kg de talidomida combinados com 25 mg/kg de sulindac.

Observa-se também um efeito aditivo na combinação de fármacos anti-inflamatórios não esteróides e doutros compostos inibidores de angiogénese tais como a combinação de sulindac e AMG-1470. O AMG-1470 é um composto inibidor de angiogénese conhecido como mostrado em Brem *et al.* Ocorre uma resistência mínima ao fármaco após terapia antiangiogénica prolongada com AMG-1470, *Surgical Forum* 45 (0), 1994, págs. 674-677, aqui incorporada por referência. Como se mostra no quadro anterior, o sulindac mais AMG-1470 mostra um efeito inibidor superior na angiogénese do que qualquer dos compostos sozinhos.

Exemplo I

Utiliza-se o ensaio da membrana corioalantóica de embrião de pinto, descrito por Crum *et al.*, *Science* 230:1375 *et seq.* (1985), para identificar compostos que não requerem conversão metabólica adicional. Ver também, Patente U.S. N.º 5001116, aqui incorporada por referência, que descreve o ensaio CAM na col. 7 da patente. Resumidamente, removeram-se embriões de pinto fertilizados das suas cascas nos dias 3 ou 4, e implantou-se um disco de metilcelulose contendo o composto na membrana corioalantóica. Examinaram-se os embriões 48 horas mais tarde, se surgisse uma zona avascular límpida à volta do disco de metilcelulose, media-se o diâmetro dessa zona.

Exemplo II

Ensaio de angiogénese de córnea de coelho

Prepararam-se peletes para implantação em córneas de coelho misturando 110 µl de solução salina contendo 12 µg de bFGF recombinante (Takeda Pharmaceuticals - Japão) com 40 mg de sucralfato (Bukh Meditec - Dinamarca); adicionou-se esta

suspensão a 80 µl de hydon a 12% (Interferon Sciences) em etanol. Pipetaram-se depois alíquotas de 10 µl desta mistura para cima de cavilhas de Teflon e deixaram-se secar produzindo aproximadamente 17 peletes. Implantou-se um pelete no interior de microbolsas corneais de cada olho de um coelho New Zeland White, fêmea, anestesiado, a 2 mm do limbo seguindo-se a aplicação tópica de pomada de eritromicina sobre a superfície da córnea. Alimentaram-se os animais diariamente desde os 2 dias pós-implantação por sonda gástrica quer com droga suspensa em carboximetilcelulose a 0,5% quer com carboximetilcelulose a 0,5% sozinha. A talidomida foi comprada na Andrulus Pharmaceutical (Maryland) e o EM-12 e supidimida foram gentilmente fornecidos pela Grunenthal GMBH (Alemanha). Os animais foram examinados com uma lâmpada de fenda dia sim, dia não, com ocultação, pelo mesmo especialista da córnea. Determinou-se a área de neovascularização corneal medindo com um retículo o comprimento do vaso (L) a partir do limbo e o número de horas de relógio (C) de limbo envolvidas. Utilizou-se uma fórmula para determinar a área de um segmento de banda circular: $C/12 * 3,1416 [r^2 - (r-L)^2]$ onde $r = 6$ mm, o raio medido da córnea de coelho. Utilizaram-se vários modelos matemáticos para determinar a quantidade de córnea vascularizada, e verificou-se que esta fórmula proporcionava a aproximação mais exacta da área da banda de neovascularização que cresce na direcção do pelete.

É importante notar que é preferível o ensaio de córnea de coelho porque este reconhecerá geralmente compostos que são inactivos *per se* mas que são metabolizados para proporcionar compostos activos. Compostos relacionados com talidomida, como se mostra a seguir no Exemplo III, são conhecidos por serem teratogénicos e são candidatos para utilização no presente invento.

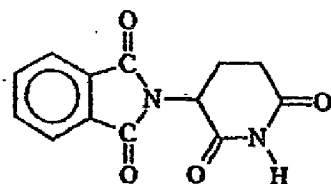
Exemplo III

Inibição de neovascularização corneal induzida por bFGF por talidomida e análogo relacionado expressa como percentagem de mediana do controlo no dia 8

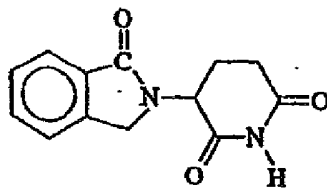
Peletes contendo bFGF e sucralfato foram implantados no interior de microbolsas de ambas as córneas de coelhos de acordo com Exemplo II. O crescimento de vasos para o interior de córnea límpida a partir do limbo foi primeiro notado no

dia 2 e os tratamentos (200 mg/kg oralmente) foram iniciados nesse dia. Mediu-se a área de neovascularização corneal desde o dia 4 até ao dia 12. Utilizaram-se as medições no dia 8 para comparação entre grupos. Não se observou qualquer regressão de vasos e neovascularização máxima próxima neste momento. Realizou-se a análise estatística com ANOVA com dados ordenados para contabilizar a variação entre experiências e proteger contra uma distribuição não normal de resultados (*i.e.* "outliers") utilizando um método não paramétrico.

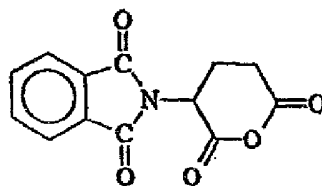
Os compostos testados foram os seguintes:



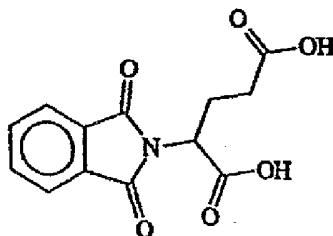
talidomida



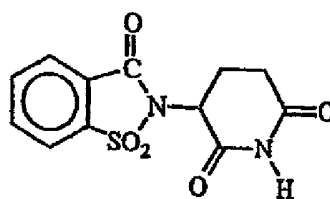
EM-12



Anidrido ftaloíलगlutâmico (PGA)



Ácido ftaloíलगlutâmico (Ácido PG)



supidimida

O tratamento com uma dose de talidomida (200 mg/kg) resultou numa inibição da área de córnea vascularizada que variou de 30-51% em três experiências, com uma inibição mediana de 36% (Figura 6) ($n = 30$ olhos, $p = 0,0001$, ANOVA de dois factores com dados ordenados). Observou-se a inibição de angiogénese por talidomida apenas após duas doses (Figura 7). Os coelhos não demonstraram sedação óbvia e não se verificaram quaisquer sinais de toxicidade ou perda de peso. O análogo teratogénico EM-12, que partilha as outras propriedades da talidomida, foi também inibidor, com uma inibição mediana de 42% ($n = 10$ olhos, $p = 0,002$, ANOVA de um factor com dados ordenados). A supidimida, um análogo não teratogénico de talidomida que mantém as propriedades sedativas de talidomida, não exibiu qualquer actividade (área 107% do controlo, $n = 10$ olhos, não estatisticamente diferente do controlo). Outros análogos, PGA e ácido PG exibiram efeitos inibidores mais fracos do que a talidomida (resultados não mostrados). A densidade de crescimento para o interior de vasos em animais tratados com talidomida foi também acentuadamente reduzida.

Exemplo IV

EM-12 no ensaio de córnea de coelho

O EM-12 foi testado no ensaio de córnea de coelho descrito no Exemplo II para 100 mg/kg/dia mostrou 21% de inibição, e para 200 mg/kg/dia o ensaio mostrou 43% de inibição.

Exemplo V

Ácido ftaloílgutâmico em CAM

O ácido ftaloílgutâmico foi testado no ensaio CAM acima descrito e exibiu uma zona avascular com uma cicatriz moderada.

Exemplo VI*Ácido ftaloílgltutâmico no ensaio de córnea de coelho*

O ácido ftaloílgltutâmico descrito acima para 200 mg/kg e exibiu 29% de inibição de angiogénese.

Exemplo VII*Anidrido ftaloílgltutâmico no ensaio CAM*

O anidrido ftaloílgltutâmico foi testado no ensaio CAM acima descrito e exibiu uma zona avascular.

Exemplo VIII*Tratamento de doença de Crohn*

Tratou-se uma paciente fêmea de 32 anos de idade com doença de Crohn utilizando os métodos do presente invento. A paciente exibiu os sintomas característicos da doença de Crohn, *i.e.*, complicação gastrintestinal grave (incluindo diarreia e cólicas) e uma grande lesão na pele da perna. Foi-lhe administrada oralmente talidomida numa dosagem de 100 mg duas vezes ao dia. Depois, continuou-se o tratamento durante uma semana, os sintomas gastrintestinais, incluindo a diarreia e cólicas, foram aliviados e a lesão da pele resolvida.

Exemplo IX*Ensaio de microbolsa corneal*

Obtiveram-se ratinhos machos C57B16 de seis a oito semanas de idade nos Jackson Laboratories, MA. Anestesiaram-se os ratinhos, e fizeram-se bolsas de 0,4 × 0,4 mm no estroma da córnea adjacente ao limbo. Peletes contendo 80 ng de qualquer um de bFGF ou VEGF foram implantados nas bolsas. Os peletes contendo bFGF foram implantados a 1,0-1,2 mm dos vasos límbicos, enquanto os peletes contendo VEGF foram implantados a 0,5-0,7 mm dos vasos límbicos. Aplicou-se depois eritromicina topicamente.

Os ratinhos foram depois tratados com doses variáveis de fármacos anti-inflamatórios como se mostra na tabela abaixo. A resposta vascular aos peletes foi medida pelo comprimento de vaso máximo e pelo número de horas de relógio de neovascularização 5 dias após implantação dos peletes de bFGF

e 6 dias após implantação dos peletes de VEGF. Calculou-se a área de neovascularização corneal utilizando a fórmula seguinte, que melhor se aproxima da área de neovascularização: Área (mm²) = [π × horas de relógio × comprimento (mm) × 0,2 (mm)]. Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

AGENTE	DOSE	bFGF ¹	VEGF ²	N	valor p
Acetaminofeno	100 mg/kg	0	-	8	ns
Aspirina	10-160 mg/kg	0-11	-	8	ns
NDGA	25 mg/kg	30	-	8	ns
Esculetina	200 mg/kg	15	-	8	0,02
Fenidona	100 mg/kg	17	-	8	<0,01
Quercetina	300 mg/kg	18	-	8	<0,01
Ibuprofeno	25 mg/kg	6	8	23/8	ns/ns
Cetoprofeno	80 mg/kg	30	41	8/8	<0,01
Indometacina	5 mg/kg	59	61	15/21	<0,01/<0,01
Sulindac	25 mg/kg	50	55	15/15	<0,01/<0,01

¹ % Inibição de angiogénese induzida por bFGF

² % Inibição de angiogénese induzida por VEGF

O efeito inibidor está expresso em percentagem representando a área de neovascularização corneal quer por bFGF quer por VEGF em comparação com os controlos (n = 8/experiência) das experiências nas quais esse fármaco particular foi testado. N = o número de olhos que foram testados e os fármacos foram dados uma vez ao dia sc, ip ou oral como descrito.

Exemplo X

Obtiveram-se ratinhos machos C57B16 de seis a oito semanas de idade nos Jackson Laboratories, MA. Anestesiaram-se os ratinhos, e fizeram-se bolsas de 0,4 × 0,4 mm no estroma da córnea adjacente ao limbo. Peletes contendo 80 ng de qualquer um de bFGF ou VEGF foram implantados. Os peletes contendo bFGF foram implantados a 1,0-1,2 mm dos vasos límbicos, enquanto os peletes contendo VEGF foram implantados a 0,5-0,7 mm dos vasos límbicos. Aplicou-se depois eritromicina topicamente.

Os ratinhos foram depois tratados com talidomida, indometacina, sulindac ou combinações de talidomida quer com

indometacina quer com sulindac. A resposta vascular aos peletes foi medida pelo comprimento de vaso máximo e pelo número de horas de relógio de neovascularização 5 dias após implantação dos peletes de bFGF e 6 dias após implantação dos peletes de VEGF. Calculou-se a área de neovascularização corneal utilizando a fórmula seguinte, que melhor se aproxima da área de neovascularização: Área (mm²) = [$\pi \times$ horas de relógio \times comprimento (mm) \times 0,2 (mm)]. Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

AGENTE	DOSE	bFGF ¹	VEGF ²	n
Talidomida	200 mg/kg	41	40	31/39
Indometacina	5 mg/kg	59	61	15/21
Sulindac	25 mg/kg	50	55	15/15
Talidomida + indometacina	200 mg/kg + 5 mg/kg	67	61	15/21
Talidomida + sulindac	200 mg/kg + 25 mg/kg	63 ³	74 ³	15/16

¹ % Inibição de angiogénese induzida por bFGF

² % Inibição de angiogénese induzida por VEGF

³ Efeito inibidor é significativamente diferente de qualquer dos agentes sozinho (p <0,01, testado por ANOVA)

O efeito inibidor está expresso em percentagem representando a área de neovascularização corneal quer por bFGF quer por VEGF em comparação com os controlos (n = 8/experiência) das experiências nas quais esse fármaco particular foi testado. N = o número de olhos que foram testados e os fármacos foram dados uma vez ao dia sc, ip ou oral como descrito.

Exemplo XI

Obtiveram-se ratinhos machos C57B16 de seis a oito semanas de idade nos Jackson Laboratories, MA. Anestesiaram-se os ratinhos, e fizeram-se bolsas de 0,4 \times 0,4 mm no estroma da córnea adjacente ao limbo. Peletes contendo 80 ng de bFGF nas bolsas foram implantados a 1,0-1,2 mm dos vasos límbicos. Aplicou-se depois eritromicina topicamente.

Os ratinhos foram depois tratados com sulindac, ou com um dos derivados de sulindac, sulindac sulfona ou sulindac sulfureto. A resposta vascular aos peletes foi medida pelo comprimento de vaso máximo e pelo número de horas de relógio de neovascularização 5 dias após implantação dos peletes de bFGF. Calculou-se a área de neovascularização corneal utilizando a fórmula seguinte, que melhor se aproxima da área

de neovascularização: Área (mm²) = [$\pi \times$ horas de relógio \times comprimento (mm) \times 0,2 (mm)]. Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

AGENTE	DOSE	% de inibição	n
Sulindac	25 mg/kg	50	15
Sulindac sulfureto	25 mg/kg	31	8
	50 mg/kg	34	8
Sulindac sulfona	25 mg/kg	31	16

O efeito inibidor está expresso em percentagem representando a área de neovascularização corneal por bFGF em comparação com os controlos (n = 8/experiência). N = o número de olhos que foram testados e os fármacos foram dados uma vez ao dia sc, ip ou oral como descrito.

Exemplo XII

Ensaio de tumor

Utilizaram-se coelhos fêmea New Zealand White, pesando aproximadamente 1,5 kg, obtidos no Charles River, MA, para propagação do carcinoma V2. Este tumor tem origem num papiloma induzido por vírus Shope. Implantaram-se pequenos pedaços de 0,5 \times 0,5 cm intramuscularmente na coxa direita. O tratamento com talidomida 200 mg/kg/dia (n = 14), com sulindac 60 mg/kg/dia (n = 5), ou com uma combinação de talidomida e sulindac (n = 10) foi iniciado ao dia 10 após implantação do tumor, quando o volume médio do tumor era 6 cm³. Os animais de controlo (n = 13) foram tratados com metilcelulose. Sacrificaram-se os coelhos 17 dias após o início do tratamento, quando o volume médio dos tumores de controlo era 100 cm³. Os resultados desta experiência (Figura 8) mostram que a combinação de talidomida e sulindac é mais eficaz na redução do tamanho de tumores de carcinoma V2 do que qualquer um de talidomida ou sulindac sozinho. A combinação de talidomida e sulindac inibiu o crescimento do tumor em 75% e foi significativamente diferente (p<0,05), quer de qualquer dos agentes sozinho, quer do grupo de controlo. O tratamento oral com sulindac ou talidomida inibiu o crescimento de tumor, respectivamente, 35% (n = 5, p < 0,01) e 55% (n = 14, p < 0,01). Os resultados foram recolhidos em 3 experiências em separado e cada barra representa o erro padrão da média.

Lisboa, 2008-10-15

REIVINDICAÇÕES

1. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona para utilização no tratamento de cancro.

2. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona, de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade de talidomida é de 0,1 a 300 mg/kg/dia.

3. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona, de acordo com a reivindicação 2, em que a quantidade de talidomida é de 0,5 a 50 mg/kg/dia.

4. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona, de acordo com a reivindicação 3, em que a quantidade de talidomida é de 1 a 10 mg/kg/dia.

5. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona, de acordo com a reivindicação 1, em que a talidomida e a dexametasona se destinam a ser administradas parentericamente.

6. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona, de acordo com a reivindicação 1, em que a talidomida e a dexametasona se destinam a ser administradas oralmente.

7. Quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona, de acordo com a reivindicação 1, na forma de uma composição farmacêutica que compreende talidomida, dexametasona e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

8. Composição farmacêutica que compreende talidomida e dexametasona e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que a talidomida está presente numa quantidade adequada para a administração de 0,1 a 300 mg/kg/dia.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, em que a talidomida está presente numa quantidade adequada para a administração de 0,5 a 50 mg/kg/dia.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, em que a talidomida está presente numa quantidade adequada para a administração de 1 a 10 mg/kg/dia.

12. Composição de acordo com a reivindicação 8, que é adequada para administração parentérica.

13. Composição de acordo com a reivindicação 8, que é adequada para administração oral.

14. Utilização de uma quantidade eficaz de talidomida em combinação com dexametasona para o fabrico de um medicamento para utilização num método de tratamento de cancro.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o medicamento compreende talidomida e dexametasona.

Lisboa, 2008-10-15

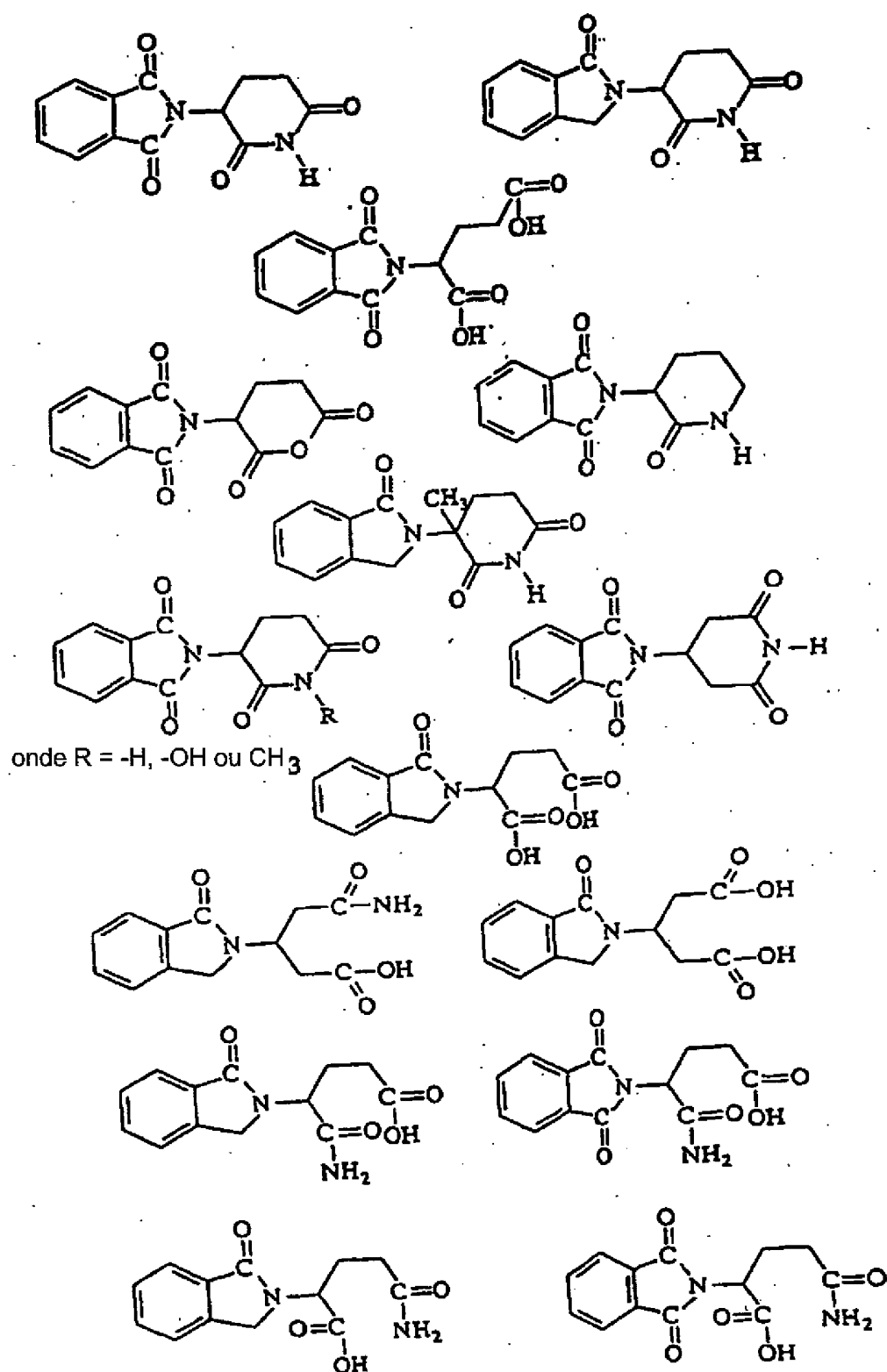


Figura 1

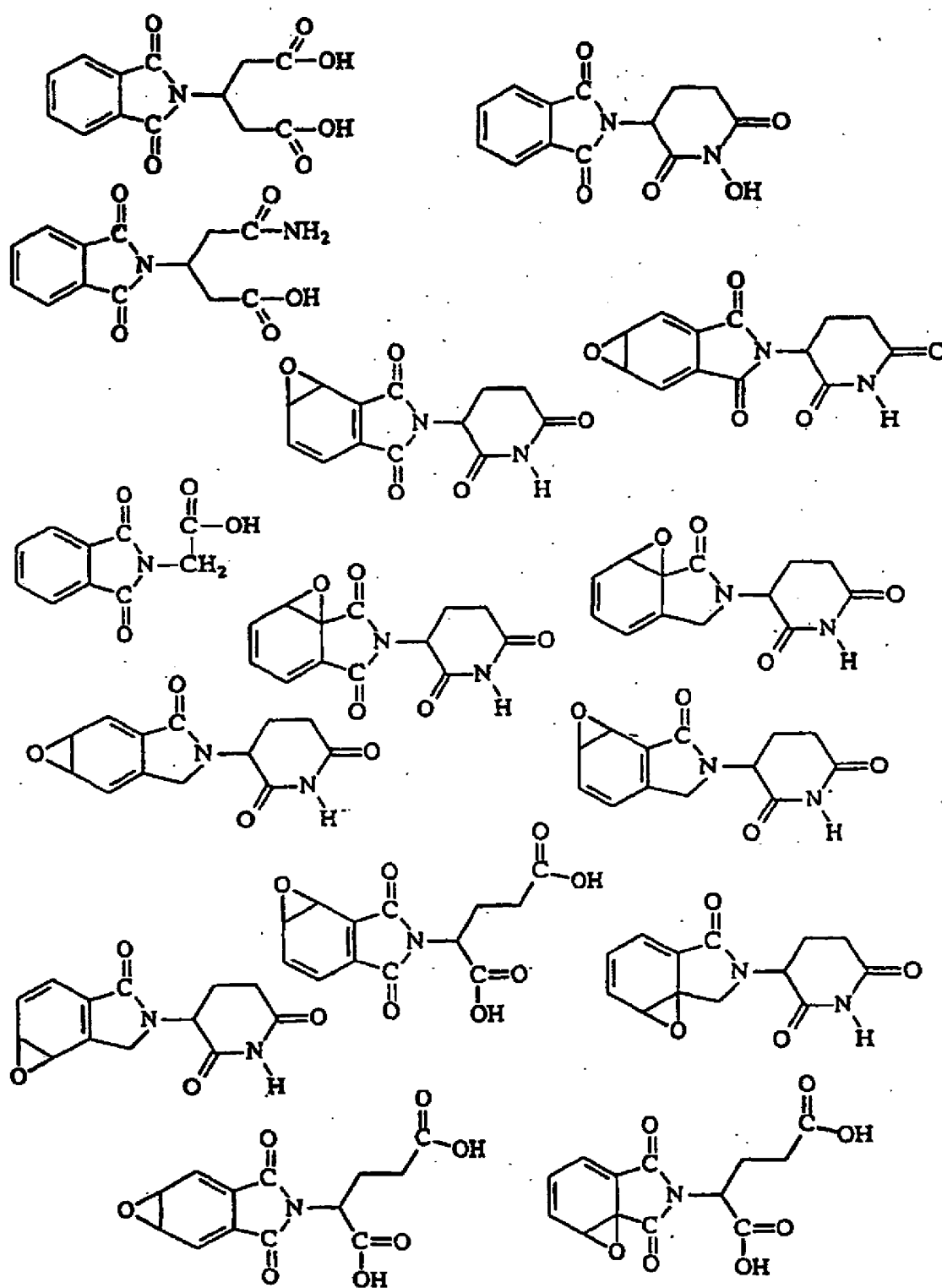


Figura 2

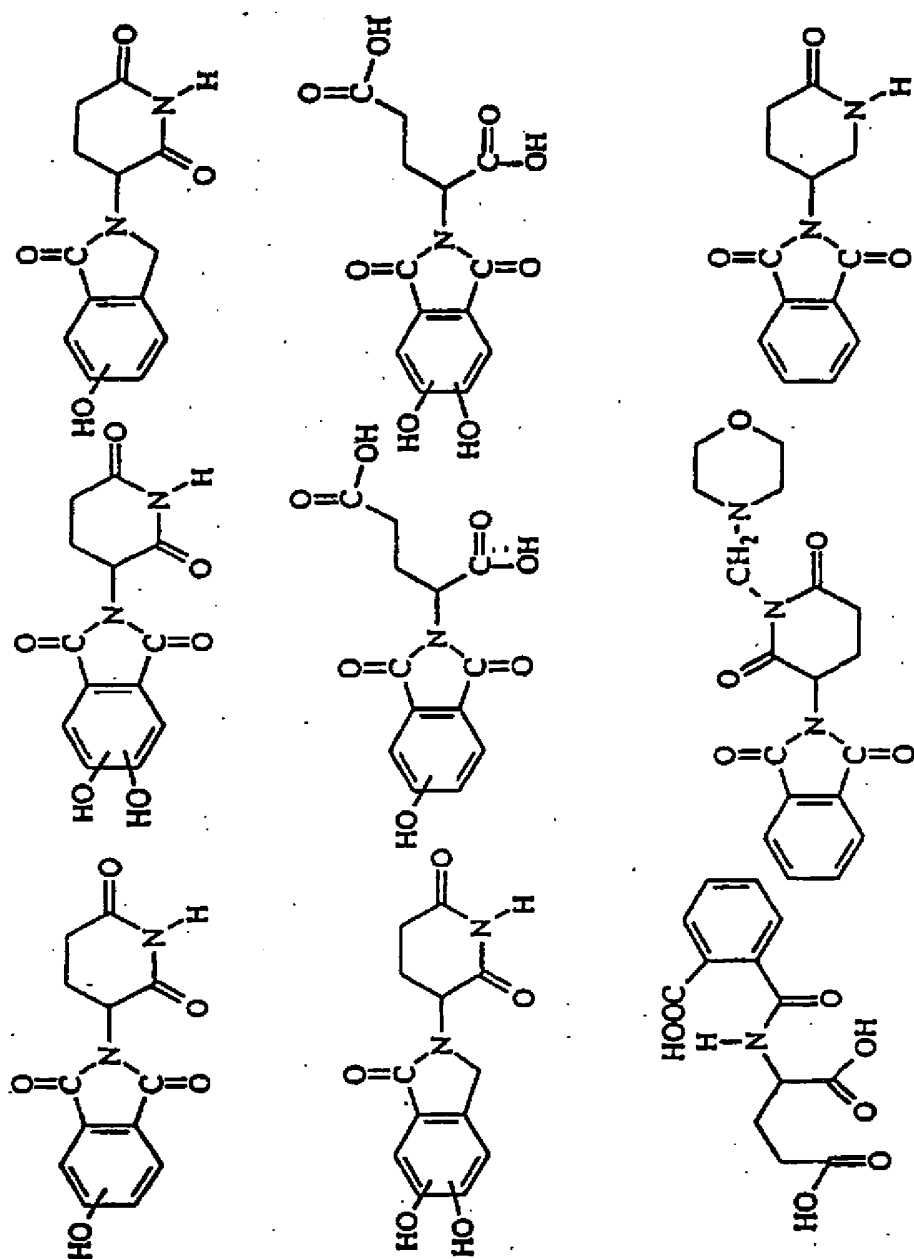


Figura 3

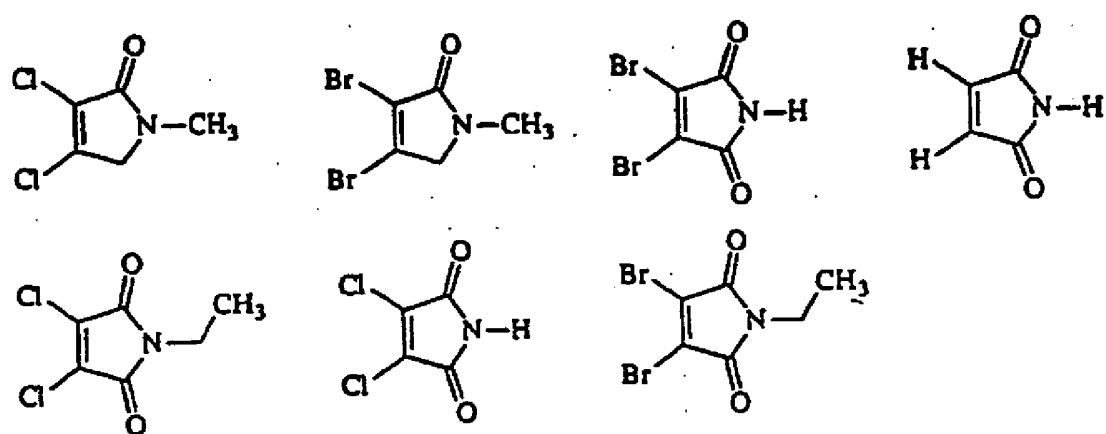


Figura 4

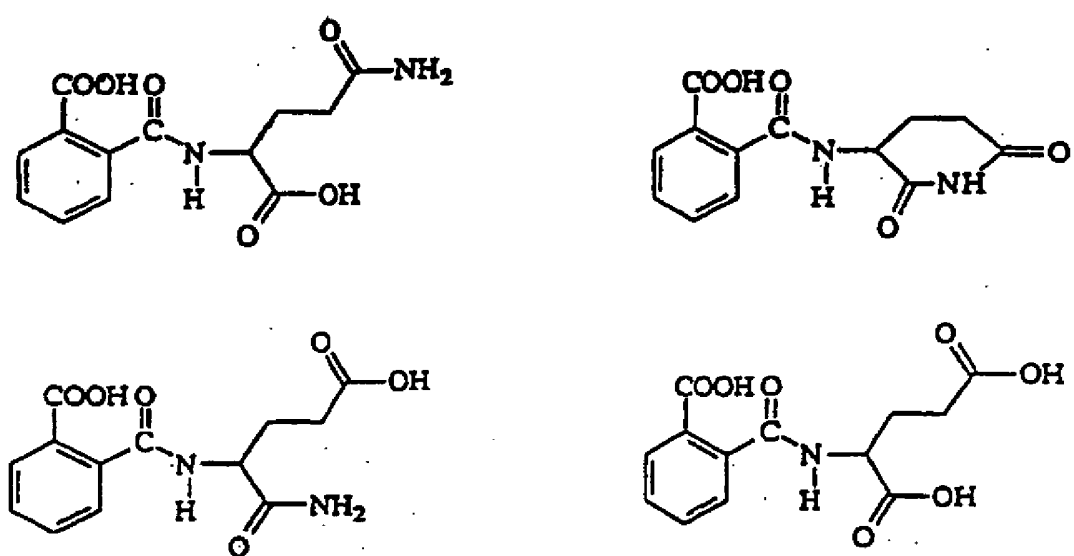


Figura 5

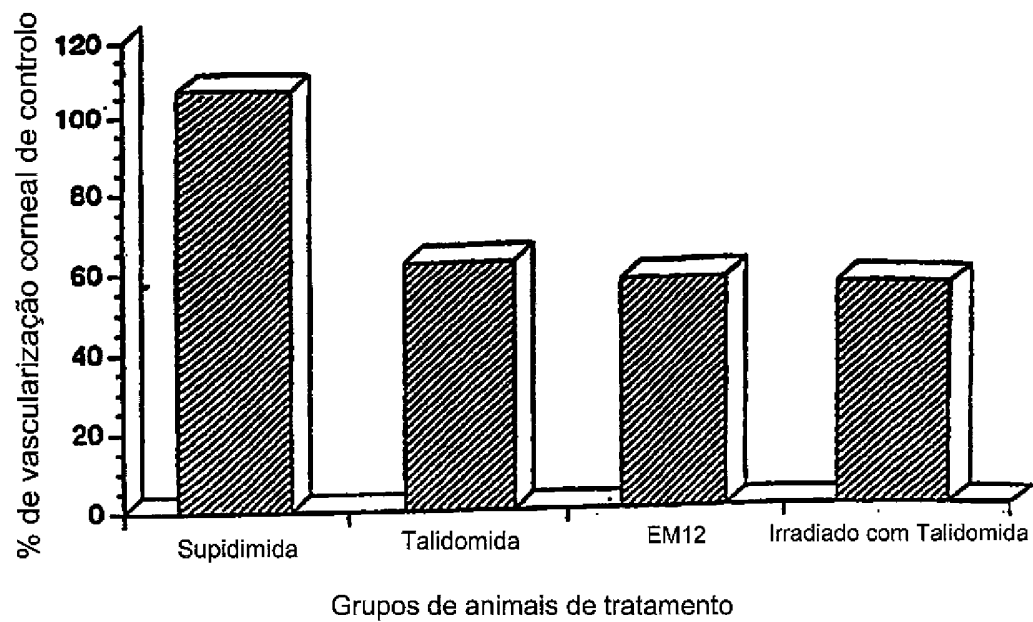


Figura 6

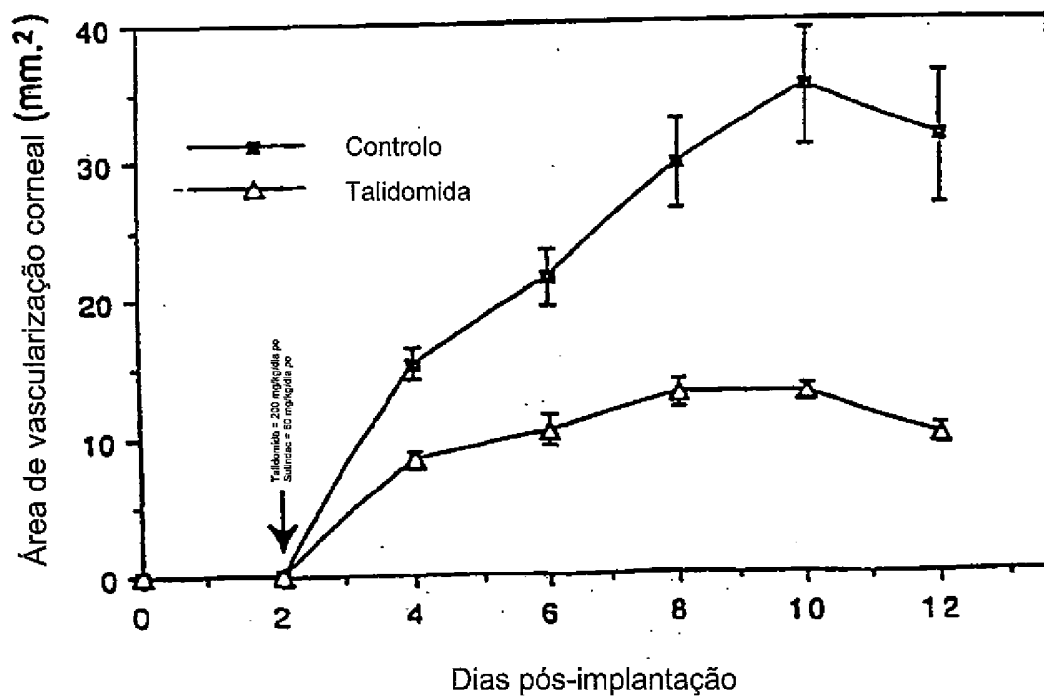


Figura 7

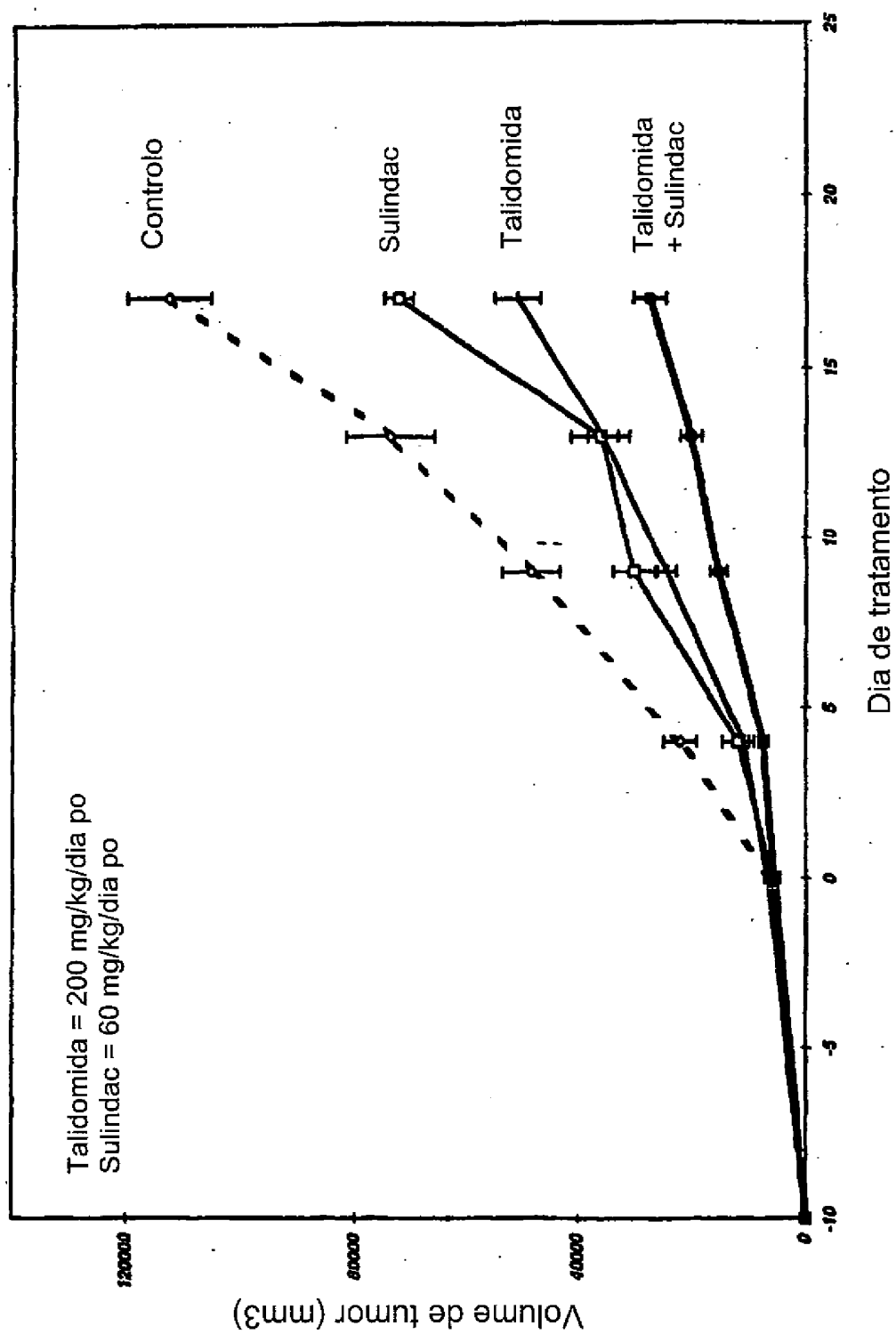


Figura 8