

(11) Número de Publicação: **PT 1621077 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 33/36 (2007.10) **A61P 35/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1998.10.15	(73) Titular(es): POLARX BIOPHARMACEUTICALS, INC. 48TH FLOOR, 787 SEVENTH AVENUE NEW YORK, NY 10019 US
(30) Prioridade(s): 1997.10.15 US 62375	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.02.01	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.09.24 216/2008	(72) Inventor(es): RALPH M. ELLISON US FRED H. MERMELSTEIN US
	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO TRIÓXIDO DE ARSÊNICO
PARA O TRATAMENTO DE UM TUMOR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO TRIÓXIDO DE ARSÊNICO PARA O TRATAMENTO DE UM TUMOR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL"

A invenção refere-se à utilização de compostos de arsênico para tratar várias doenças neoplásicas (ver as curvas de dose-resposta na Figura). Além disso, os compostos de arsênico podem ser utilizados para tratar doenças neoplásicas metastáticas.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO TRIÓXIDO DE ARSÊNICO PARA O TRATAMENTO DE UM TUMOR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL"

1. CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos e composições para o tratamento de um tumor no sistema nervoso central, seleccionado do grupo consistindo de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma. Na prática do tratamento de cancro, as composições contendo trióxido de arsénico são utilizadas para parar ou reverter o crescimento neoplásico.

Mais especificamente, a presente invenção refere-se a novos métodos quimioterapêuticos - novas utilizações de trióxido de arsénico para o tratamento de um tumor no sistema nervoso central, seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Em 1997, mais de um milhão de pessoas nos Estados Unidos irão desenvolver algum tipo de cancro. Aproximadamente 500000 serão curados ou estarão num estado de remissão. Estes números representam uma melhoria na taxa de cura observada ao longo da última década que ocorre, em grande parte, devido a uma detecção precoce, melhor tratamento e avanços na quimioterapia. Em

particular, os avanços na quimioterapia incluem terapia direccionada e específica com fármacos, na qual um fármaco é especificamente desenvolvido para o tratamento de um determinado tipo de cancro. Esta abordagem “direccionada para a doença” é concebida para identificar compostos que exercem efeitos selectivos *in vitro* sob tipos de cancros em particular e acompanhar estes indícios *in vivo*, utilizando linhas celulares (Fiebig et al., Cancer Treatment Reviews 17:109-117 (1990)). No entanto, a incidência de cancro continua a aumentar à medida que a população envelhece e à medida que novos cancros se desenvolvem ou ocorrem mais frequentemente, tais como em doentes infectados com o vírus da SIDA. Deste modo, é evidente que existe uma grande necessidade de regimes adicionais para tratar doentes com cancro.

2.1. Patobiologia do Cancro

O cancro é caracterizado, principalmente, por um aumento no número de células anormais derivadas de um determinado tecido normal, invasão de tecidos adjacentes por estas células anormais e disseminação através do sangue e linfa de células malignas para nódulos linfáticos regionais e para locais distantes (metástases). Os dados clínicos e estudos de biologia molecular indicam que o cancro é um processo de múltiplos passos que começa com pequenas alterações pré-neoplásicas, que podem, sob determinadas condições, progredir para neoplasia.

O crescimento celular anormal pré-maligno é exemplificado por hiperplasia, metaplasia ou, de um modo muito particular, displasia (para revisão de tais condições de crescimento anormal, ver Robbins e Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª Ed.,

W.B. Saunders Co., Filadélfia, p. 68-79). A hiperplasia é uma forma de proliferação celular controlada, envolvendo um aumento no número de células num tecido ou órgão, sem alteração significativa na estrutura ou função. Apenas como um exemplo, a hiperplasia endometrial precede, muitas vezes, o cancro do endométrio. A metaplasia é uma forma de crescimento celular controlado na qual um tipo de células adultas ou totalmente diferenciadas, substitui outro tipo de células adultas. A metaplasia pode ocorrer em células do tecido epitelial ou conjuntivo. A metaplasia atípica envolve um epitélio metaplásico um pouco desordenado. A displasia é, frequentemente, um precursor de cancro e encontra-se principalmente no epitélio; é a forma mais desorganizada de crescimento celular não neoplásico, envolvendo uma perda da uniformidade celular individual e da orientação arquitectónica das células. As células displásicas apresentam, muitas vezes, núcleos anormalmente grandes intensamente corados e exibem pleomorfismo. A displasia ocorre, de um modo característico, quando existe irritação ou inflamação crónica e é, muitas vezes, observada no cérvix, vias respiratórias, cavidade oral e vesícula biliar.

A lesão neoplásica pode evoluir clonalmente e desenvolver uma capacidade crescente para invasão, crescimento, metástase e heterogeneidade, especialmente sob condições nas quais as células neoplásicas fogem à vigilância imunitária do hospedeiro (Roitt, I., Brostoff, J e Kale, D., 1993, Immunology, 3ª ed., Mosby; St. Louis, ps. 17.1-17.12).

2.3. Tumores do SNC Primários e Metastáticos

A incidência de tumores cerebrais primários e metastáticos está a aumentar nos Estados Unidos. Na realidade, o arsenal de quimioterapêuticos para estes tipos de cancros é mínimo, enquanto a necessidade de tais terapêuticos é elevada.

O glioblastoma multiforme e outros tumores do sistema nervoso central, primários e metastáticos, são malignidades devastadoras. O tratamento destes tumores inclui cirurgia, terapia de radiação e tratamento com agentes, tal como a nitrosourea BCNU. Outros agentes quimioterapêuticos utilizados incluem procarbazina, vincristina, hidroxiureia e cisplatina. Infelizmente, mesmo quando todas as três modalidades (cirurgia, terapia de radiação e quimioterapia) são utilizadas, a sobrevivência média dos doentes com malignidades do sistema nervoso central é ainda de cerca de 57 semanas. Evidentemente, são necessárias novas abordagens de tratamento para doentes com tumores do sistema nervoso central primários e metastáticos, recentemente diagnosticados, bem como para doentes com tais tumores que são refractários às modalidades anteriores. A descoberta de novos agentes tem sido complicada devido à inexistência de um modelo animal que permita prever qual dos agentes será quimicamente eficaz contra tumores do sistema nervoso central primários e metastáticos.

2.6. Arsénico e as suas Utilizações Médicas

Durante muito tempo o arsénico foi considerado como sendo um veneno e um fármaco na prática médica Ocidental e Chinesa. Na última parte do século dezanove, o arsénico foi frequentemente

utilizado em tentativas de tratar doenças do sangue no Ocidente. Em 1878, foi referido que o tratamento de um doente com leucemia com solução de Fowler (uma solução de arsenito de potássio) reduziu acentuadamente a contagem de glóbulos brancos (Cutler e Bradford, Am. J. Med. Sci., Janeiro de 1878, 81-84). Outros interesses na utilização da solução de Fowler como um agente paliativo para tratar leucemia mielóide crónica (CML) são descritos por Forkner e Scott em 1931 (J. Am. Med. Assoc., 1931, iii, 97) e depois confirmada por Stephens e Lawrence em 1936 (Ann. Intern. Med. 9, 1488-1502). Tipicamente, a solução de Fowler foi administrada oralmente a doentes com leucemia como uma solução até o nível de glóbulos brancos diminuir para um nível aceitável ou até se desenvolverem toxicidades (tais como queratoses da pele e hiperpigmentação), enquanto os doentes apreciam períodos variados de remissão. Nos anos 60, a solução de Fowler foi ainda utilizada, ocasionalmente, em tentativas para tratar CML, no entanto, a maioria dos doentes com CML foram tratados com outros agentes quimoterapêuticos, tais como bussulfano e/ou terapia de radiação (Monfardini *et al.*, Cancer, 1973, 31:492-501).

Paradoxalmente, um dos efeitos há muito reconhecidos da exposição ao arsénico, quer seja a fonte ambiental ou medicinal, é o cancro da pele (Hutchinson, 1888, Trans. Path. Soc. Lond., 39:352; Neubauer, 1947, Br. J. Cancer, 1:192). Existem mesmo dados epidemiológicos que sugerem que a utilização de solução de Fowler durante longos períodos de tempo, pode conduzir a um aumento na incidência de cancro em locais internos (Cuzick *et al.*, Br. J. Cancer, 1982, 45:904-911; Kaspar *et al.*, J. Am. Med. Assoc., 1984, 252:3407-3408). Desde então, a carcinogenicidade do arsénico tem sido demonstrada pelo facto de conseguir induzir aberração cromossómica, amplificação génica,

permutas de cromatídeos irmãos e transformação celular (Ver e.g., Lee et al., 1988, Science, 241:79-81; e Germolec et al., Toxicol. Applied Pharmacol., 1996, 141:308-318). Devido ao efeito carcinogénico conhecido do arsénico, actualmente, a sua única utilização terapêutica em humanos na medicina Ocidental é no tratamento de doenças tropicais, tal como Tripanosomose Africana (melarsoprol ou Arsobal® por Rhône Poulenc Rorer, Collegeville, PA; Ver Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª edição, capítulo 66, 1659-1662, 1997).

Na medicina tradicional chinesa, a pasta de ácido arsenoso ou trióxido de arsénico têm sido utilizadas para tratar doenças da medula do dente, psoríase, sífilis e reumatose (Chen et al., 1995, em Manual of Clinical Drugs, Shanghai, China, Shanghai Institute of Science and Technology, p.830). Nos anos 70, o trióxido de arsénico tem sido aplicado experimentalmente para tratar leucemia promielocítica aguda (APL) na China (comentado por Mervis, 1996, Science, 273:578). A eficácia clínica do trióxido de arsénico foi recentemente re-investigado em 14 de 15 doentes com APL refractária, onde foi indicado que a utilização de uma dose intravenosa a 10 mg/dia, durante 4-9, semanas resultou na remissão morfológica completa sem supressão da medula óssea associada (Shen et al., 1997, Blood, 89:3354-3360). Foi também referido que o trióxido de arsénico induziu apoptose (morte celular programada) *in vitro* em células NB4, uma linha celular de APL, e que a apoptose está, aparentemente, associada à regulação negativa do oncogene bcl-2 e redistribuição intracelular da proteína quimérica PML/RAR α , que são específicas das células APL (Chen et al., 1996, Blood, 88:1052-1061; Andre et al., 1996, Exp. Cell Res. 229:253-260). De um modo semelhante, foi indicado que o melarsoprol induz apoptose em linhas celulares representativas de leucemia crónica das células

B (Konig et al., 1997, Blood 90:562-570). É actualmente desconhecido se a apoptose é induzida em doentes com APL, mas alguns acreditam que seja um dos mecanismos possíveis dos efeitos terapêuticos de determinados compostos de arsénico.

Embora o arsénico seja conhecido como sendo um veneno e um agente carcinogénico, existem muitos artigos que se referem à utilização de arsénico no tratamento médico.

Além disso, a partir da discussão anterior, deverá ser evidente que existe uma pletora de diferentes tipos de cancros, cada um dos quais necessitando de um protocolo de tratamento único. Assim, o desenvolvimento de um agente anticancerígeno de espectro amplo é extremamente desejado. No mínimo, são necessários agentes anticancerígenos eficazes adicionais para serem adicionados ao arsenal contra o cancro.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Independentemente dos artigos contraditórios na técnica, no que se refere aos benefícios e riscos da administração de arsénico a doentes, os requerentes descobriram que o trióxido de arsénico apresenta uma aplicabilidade ampla no tratamento de vários cancros. A presente invenção engloba a utilização de trióxido de arsénico na preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor do sistema nervoso central seleccionado do grupo consistindo de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma.

De acordo com a presente invenção, o trióxido de arsénico pode ser utilizado isolado ou em combinação com outros agentes

terapêuticos conhecidos (incluindo quimioterapêuticos, radioprotectores e radioterapêuticos) ou técnicas de modo a melhorar a qualidade de vida do doente ou para tratar a doença neoplásica primária. Por exemplo, o trióxido de arsénico pode ser utilizado antes, durante ou depois da administração de um ou mais agentes antitumorais conhecidos, incluindo, mas não limitados a compostos de mostarda, mostarda nitrogenada, clorambucilo, melfalano, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, floxuridina, metotrexato, vincristina, vinblastina, taxol, etoposido, temiposido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, cisplatina, carboplatina, fosfato de estramustina, hidroxiureia, BCNU, procarbazina, VM-26 (vumon), interferões e ácido retinóico all-trans (ATRA), (Ver por exemplo, the Physician Desk References 1997). Além disso, os compostos de arsénico podem ser utilizados antes, durante ou depois do tratamento de irradiação. Para o tratamento de indivíduos infectados com VIH, o trióxido de arsénico pode ser utilizado isoladamente ou em combinação com AZT, ddI, ddA, ddC, d4T, 3TC e outros agentes antivirais conhecidos.

Sem desejar estar limitado por qualquer teoria, a requerente acredita que o trióxido de arsénico da invenção pode apresentar um ou mais mecanismos de acção em associação com os métodos aqui descritos. Por exemplo, o trióxido de arsénico pode actuar como um análogo fosfatado que interfere com os acontecimentos de fosforilação que ocorrem na transdução de sinal envolvida na apoptose. O arsénico pode também actuar como um inibidor da angiogénese *i. e.*, a formação de novos vasos sanguíneos limitando o fluxo sanguíneo para massas celulares pré-neoplásicas em proliferação, tumores e metástases. É bem conhecido que se um tumor não é invadido por capilares

sanguíneos, teria de depender da difusão de nutrientes a partir das suas vizinhanças e não poderia aumentar o seu tamanho para além de um determinado tamanho. O arsénico também pode funcionar como um agente de diferenciação que faz com que células cancerígenas e/ou pré-neoplásicas em divisão que apresentam um fenótipo não diferenciado ou sub-diferenciado, se desenvolvam em células diferenciadas em fase terminal e morram após um número finito de divisões celulares. Finalmente, o arsénico também pode actuar de modo a sensibilizar as células cancerígenas à radiação e/ou quimioterapia. Deste modo, o trióxido de arsénico da invenção é descrito como sendo útil contra uma variedade de cancros.

As composições particulares da invenção e suas propriedades são descritas nas secções e subsecções que se seguem.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1A-1I. Curvas dose resposta mostrando o crescimento em percentagem de várias linhas celulares de cancro, após exposição contínua a 10^{-5} a 10^{-9} µg/mL de trióxido de arsénico durante 2 dias. Figura 1A. Linhas celulares de leucemia CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR. Figura 1B. Linhas celulares de cancro das células não pequenas do pulmão A549/ATCC, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-8322M, NCI-H460, NCI-H522. Figura 1C. Linhas celulares do cancro do cólon COLO 205, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW620. Figura 1D. Linhas celulares do cancro do SNC SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251. Figura 1E. Linhas celulares de melanoma LOX 1MV1, MALME-3M, M14, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62.

Figura 1F. Linhas celulares do cancro dos ovários IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3. Figura 1G. Linhas celulares do cancro renal A498, CAKI-1, RXE 393, SN12C, TX-10, UO-31. Figura 1H. Linhas celulares do cancro da próstata PC-3, DU-145. Figura 1I. Linhas celulares do cancro da mama MCF7, NCI/ADR-RES, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D.

Figura 2. Gráficos da média mostrando padrões de selectividade a cada um dos principais parâmetros de resposta para todas as linhas celulares testadas após exposição contínua a 10^{-5} a 10^{-9} µg/mL de trióxido de arsénico durante 2 dias.

Figura 3A-3I. Curvas de resposta à dose mostrando o crescimento em percentagem de várias linhas celulares de cancro após exposição contínua a 10^{-5} a 10^{-9} µg/mL de trióxido de arsénico durante 6 dias. Figura 3A. Linhas celulares de leucemia CCRF-CEM, K-562, MOLT-4, RPMI-8226. Figura 3B. Linhas celulares de cancro das células não pequenas do pulmão, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522. Figura 3C. Linhas celulares do cancro do cólon COLO 205, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW620. Figura 3D. Linhas celulares do cancro do SNC SF-268, SF-295, SF-539, SNB-75, U251. Figura 3E. Linhas celulares de melanoma LOX IMV1, MALMI-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62. Figura 3F. Linhas celulares do cancro dos ovários IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3. Figura 3G. Linhas celulares do cancro renal 786-O, A498, CAKI-1, RXF 393, S12C, TK-10. Figura 3H. Linhas celulares do cancro da próstata DU-145. Figura 3I.

Linhas celulares do cancro da mama MCF7, NCI/ADR-RIS, MDA-MB-231/ATCC, HS 578T, MDA-MB-435, MDA-N, BR-549, T-47D.

Figura 4. Gráficos da média mostrando padrões de selectividade a cada um dos principais parâmetros de resposta, para todas as linhas celulares testadas após exposição contínua a 10^{-5} até 10^{-9} µg/mL de trióxido de arsénico durante 6 dias.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

São aqui descritos métodos e composições para o tratamento de um tumor no sistema nervoso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma. A invenção é baseada, em parte, num regime de dosagem para administração de trióxido de arsénico. A invenção é também baseada, em parte, na potência do trióxido de arsénico da invenção contra um tumor do sistema nervoso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma

A invenção inclui também um método de tratamento de um tumor do sistema nervoso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma num mamífero, que compreende administrar, a um mamífero, uma dose terapêuticamente eficaz e não letal de um ou mais compostos arsénicos.

Geralmente, o especialista na técnica irá reconhecer que a forma de trióxido de arsénico a ser utilizada deverá ser terapêuticamente eficaz sem toxicidade excessiva. A toxicidade

está dependente da dose, da forma de dosagem, do modo de administração e frequência da dosagem.

Como aqui utilizado, o "trióxido de arsénico" refere-se a uma forma farmacêuticamente aceitável de trióxido de arsénico incluindo sais, soluções, complexos, quelatos e compostos orgânicos e inorgânicos incorporando arsénico. O trióxido de arsénico da presente invenção pode ser sintetizado ou adquirido comercialmente. Por exemplo, os compostos podem ser preparados a partir de técnicas químicas bem conhecidas. (Ver por exemplo, Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology 4 ed. volume 3, ps. 633-655 John Wiley & Sons).

Numa forma de realização, o trióxido de arsénico da invenção é dissolvido numa solução aquosa de hidróxido de sódio, com o pH ajustado para uma gama fisiologicamente aceitável, e. g., cerca de pH 6-8.

Pode ser utilizado qualquer modo de administração de acordo com a presente invenção incluindo, mas não limitado a, administração parentérica, tal como administração intravenosa, subcutânea, intramuscular e intratecal; também pode ser utilizada a administração oral, intranasal, rectal ou vaginal; directamente no tumor; emplastos transdérmicos; dispositivos de implante (particularmente, para libertação lenta); finalmente, pode ser utilizada a administração tópica. O modo de administração irá variar de acordo com a doença a ser tratada.

As composições farmacêuticas a serem utilizadas podem estar na forma de soluções fisiologicamente aceitáveis estéreis (aquosas ou orgânicas), suspensões coloidais, cremes, unguentos, pastas, cápsulas, comprimidos revestidos, comprimidos e hóstias.

As composições farmacêuticas compreendendo trióxido de arsénico da invenção podem ser colocadas em recipientes e/ou ampolas de vidro estéreis selados. Além disso, o ingrediente activo pode ser micro-encapsulado, encapsulado num lipossoma, niossoma ou lipoespuma, isoladamente ou em combinação com anticorpos de direccionamento. Deverá ser reconhecido que também estão incluídas as formas de administração de libertação sustida ou lenta retardada.

Os compostos arsénicos da presente invenção podem ser utilizados contra tumores primários e metastáticos do Sistema Nervoso seleccionados de

Neuroblastoma

Retinoblastoma

Glioblastoma

Oligodendroglioma

O termo "um método para tratar tumores primários e metastáticos do sistema nervoso central" como aqui utilizado, significa que a doença e os sintomas associados com a doença são aliviados, reduzidos, curados ou, de outro modo, colocados num estado de remissão.

O termo "refractário" como aqui utilizado, significa que as malignidades são geralmente resistentes ao tratamento ou cura. O termo "refractário", quando utilizado nos termos anteriores, significa que as malignidades que são, geralmente, resistentes

ao tratamento ou cura são aliviadas, reduzidas, curadas ou colocadas num estado de remissão.

Como aqui utilizado, os termos “um agente terapêutico”, “regime terapêutico”, “radioprotector”, “quimioterapêutico” significa fármacos e terapias com fármacos convencionais, incluindo vacinas, para o tratamento de cancro, infecções virais e outras malignidades, que são conhecidas para os especialistas na técnica. Os agentes “radioterapêuticos” são bem conhecidos na técnica.

Como aqui utilizado, “um método de tratamento de cancro” ou “um método de tratamento de doenças neoplásicas” significa que a doença e os sintomas associados com a doença são aliviados, reduzidos, curados ou colocados num estado de remissão. Além disso, o crescimento do tumor é inibido e/ou o tamanho do tumor é reduzido.

Como aqui utilizado, célula pré-neoplásica refere-se a uma célula que está na transição entre uma forma normal e uma forma neoplásica; e evidência morfológica, suportada crescentemente por estudos de biologia molecular, indica que a preneoplasia progride ao longo de vários passos. O crescimento celular não neoplásico consiste em hiperplasia, metaplasia ou, de um modo muito particular, displasia (para revisão de tais condições de crescimento anormal (Ver Robbins e Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª Ed., W.B. Saunders Co., Filadélfia, p. 68-79). A hiperplasia é uma forma de proliferação celular controlada envolvendo um aumento no número de células num tecido ou órgão, sem alteração significativa na estrutura ou função. Apenas como um exemplo, a hiperplasia endometrial precede, muitas vezes, o cancro do endométrio. A metaplasia é uma forma de crescimento

celular controlado na qual um tipo de células adulta ou totalmente diferenciada substitui outro tipo de célula adulta. A metaplasia pode ocorrer em células do tecido epitelial ou conectivo. A metaplasia atípica envolve um epitélio metaplásico um pouco desordenado. A displasia é frequentemente um precursor de cancro e encontra-se principalmente no epitélio; é a forma mais desordenada de crescimento celular não neoplásico, envolvendo uma perda da uniformidade celular individual e da orientação arquitectónica das células. As células displásicas apresentam, muitas vezes, núcleos anormalmente grandes, intensamente corados e exibem pleomorfismo. A displasia ocorre, de um modo característico, quando existe irritação ou inflamação crónica e é, muitas vezes, observada no cérvix, vias respiratórias, cavidade oral e vesícula biliar. Embora as lesões pré-neoplásicas possam progredir para neoplasia, estas permanecem estáveis durante longos períodos de tempo e podem mesmo regredir, particularmente se o agente indutor for removido ou se a lesão sucumbir a um ataque imunológico pelo seu hospedeiro.

Os regimes terapêuticos e composições farmacêuticas da invenção podem ser utilizados com potenciadores de resposta imunitária adicionais ou modificadores da resposta biológica incluindo, mas não limitados a, citocinas IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF ou outros imunoestimulantes/imunomoduladores. De acordo com este aspecto da invenção, o trióxido de arsénico é administrado em terapia de combinação com um ou mais destes agentes.

5.1. Formulação

O trióxido de arsénico da invenção pode ser formulado em preparações farmacêuticas para administração a mamíferos, para o tratamento de cancro do sistema nervoso central, seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma. As composições compreendendo um composto da invenção formulado num veículo farmacêutico compatível, podem ser preparadas, embaladas, rotuladas para o tratamento de e utilizadas para o tratamento do tumor indicado, tal como tumor do sistema nervoso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma.

Se o complexo for solúvel em água, pode depois ser formulado num tampão apropriado, por exemplo, solução salina tamponada com fosfatos ou outras soluções fisiologicamente compatíveis. Alternativamente, se o complexo resultante apresentar pouca solubilidade em solventes aquosos, pode depois ser formulado com um tensioactivo não iónico, tal como Tween, polietilenoglicol ou glicerina. Depois, o trióxido de arsénico e seus solvatos fisiologicamente aceitáveis podem ser formulados para administração por inalação ou insuflação (quer através da boca ou nariz) ou administração oral, bucal, parentérica, tópica, dérmica, vaginal, dispositivo de distribuição de fármaco, e. g., material poroso ou viscoso, tal como lipoespuma, rectal ou, no caso de tumores, directamente injectados num tumor sólido.

Para administração oral, a preparação farmacêutica pode estar na forma líquida, por exemplo, soluções, xaropes ou suspensões ou podem ser apresentadas como um produto pró-fármaco para reconstituição com água ou outro veículo adequado antes da

utilização. Tais preparações líquidas podem ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmacêuticamente aceitáveis, tais como agentes de suspensão (e. g., xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras comestíveis hidrogenadas); agentes emulsionantes (e. g., lecitina ou acácia); veículos não aquosos (e. g., óleo de amêndoa, ésteres oleosos ou óleos vegetais fraccionados); e conservantes (e. g., metil ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). As composições farmacêuticas podem assumir a forma de, por exemplo, comprimidos ou cápsulas preparadas por meios convencionais com excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como agentes de ligação (e. g., amido de milho pré-gelatinado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropilmetilcelulose); enchimentos (e. g., lactose, celulose microcristalina ou hidrogenofosfato de cálcio); lubrificantes (e. g., estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (e.g., amido de batata ou amido glicolato de sódio); ou agentes humidificantes (e. g., laurilsulfato de sódio). Os comprimidos podem ser revestidos por métodos bem conhecidos na técnica.

As preparações para administração oral podem ser formuladas, de um modo adequado, para proporcionar a libertação controlada do composto activo.

Para administração bucal, as composições podem assumir a forma de comprimidos ou pastilhas formuladas de modo convencional.

Para administração por inalação, o trióxido de arsénico, para utilização de acordo com a presente invenção, é distribuído, de um modo conveniente, na forma de uma vaporização por aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou um

nebulizador, com a utilização de um propulsor adequado, e. g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada ao proporcionar uma válvula para distribuir uma quantidade doseada. As cápsulas e cartuchos de e. g., gelatina, para utilização num inalador ou insuflador, podem ser formulados contendo uma mistura de pó do composto e uma base em pó adequada, tal como lactose ou amido.

O trióxido de arsénico pode ser formulado para administração parentérica por injeção, e. g., por injeção em bolus ou infusão contínua. Tais formulações são estéreis. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, e. g., em ampolas ou em recipientes de multi-dose, com a adição de conservante. As composições podem assumir tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão. Alternativamente, o ingrediente activo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, e. g., água estéril livre de pirogénios, antes da utilização.

O trióxido de arsénico pode também ser formulado em composições rectais, tais como supositórios ou enemas de retenção, e.g., contendo bases de supositório convencionais, tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos.

Para além das formulações anteriormente descritas, o trióxido de arsénico também pode ser formulado como uma preparação de depósito. Tais formulações de acção longa podem ser administradas por implante (por exemplo, subcutaneamente ou

intramuscularmente) ou através de injeção intramuscular. Assim, por exemplo, o trióxido de arsénico pode ser formulado com materiais hidrofóbicos ou poliméricos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de permuta iónica ou como derivados pouco solúveis, por exemplo, como um sal pouco solúvel. Os lipossomas e emulsões são exemplos bem conhecidos de veículos ou veículos de distribuição para fármacos hidrofílicos.

As composições podem, se desejado, ser apresentadas numa embalagem ou dispositivo doseador que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitárias contendo o ingrediente activo. A embalagem pode, por exemplo, compreender uma folha de metal ou plástico, tal como uma embalagem em blister. A embalagem ou dispositivo doseador pode ser acompanhado por instruções para a administração.

A invenção refere-se também a kits para efectuar os regimes terapêuticos da invenção. Tais kits compreendem um ou mais recipientes com quantidades terapeuticamente eficazes do trióxido de arsénico na forma farmacêuticamente aceitável. O trióxido de arsénico num frasco de um kit pode estar na forma de uma solução farmacêuticamente aceitável, e. g., em combinação com solução salina estéril, solução de dextrose ou solução tamponada ou outro fluido estéril farmacêuticamente aceitável. Alternativamente, o complexo pode ser liofilizado ou dissecado; neste caso, o kit compreende também, opcionalmente, num recipiente, uma solução farmacêuticamente aceitável (e. g., solução salina, solução de dextrose, etc.), de um modo preferido, estéril, para reconstituir o complexo de modo a formar uma solução com o objectivo de injeção.

Noutra forma de realização, um kit compreende também um agulha ou seringa, de um modo preferido, embalada na forma estéril, para injectar o complexo e/ou um toalhete com álcool embalado. As instruções são incluídas, opcionalmente, para administração de trióxido de arsénico por um médico ou pelo doente.

A magnitude de uma dose terapêutica de um trióxido de arsénico no controlo agudo ou crónico de um tumor no sistema nervoso central, seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma irá variar de acordo com a gravidade da patologia a ser tratada e da via de administração. A dose e, possivelmente, a frequência da dose irão também variar de acordo com a idade, peso corporal, patologia e resposta do doente individual. Em geral, a dose diária total varia entre as patologias aqui descritas são, geralmente, de cerca de 10 µg a cerca de 200 mg administradas em doses divididas, administradas parentericamente, oralmente ou topicamente. Uma dose diária preferida é de cerca de 0,5 mg a cerca de 70 mg do ingrediente activo.

Os níveis sanguíneos desejados podem ser mantidos através de uma infusão contínua de um trióxido de arsénico como comprovado pelos níveis plasmáticos. Deverá ser notado que o médico responsável deverá saber como e quando terminar, interromper ou ajustar a terapia para uma dosagem inferior devido à toxicidade ou disfunções na medula óssea, fígado ou rins. Inversamente, o médico responsável saberá também como e quando ajustar o tratamento para níveis mais elevados caso a resposta clínica não seja adequada (evitando efeitos secundários tóxicos).

Novamente, pode ser empregue qualquer via de administração adequada para proporcionar ao doente uma dosagem eficaz de um trióxido de arsénico. Por exemplo, pode ser empregue a administração oral, rectal, vaginal, transdérmica, parentérica (subcutânea, intramuscular, intratecal). As formas de dosagem incluem comprimidos, trociscos, comprimidos revestidos, dispersões, suspensões, soluções, cápsulas, emplastos e semelhantes. (Ver, Remington's Pharmaceutical Sciences.)

As composições farmacêuticas compreendem um trióxido de arsénico como o ingrediente activo ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e podem também conter um veículo farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos, por exemplo, antivirais. O termo "sais farmacêuticamente aceitáveis" refere-se a sais preparados a partir de ácidos e bases não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo bases e ácidos inorgânicos e orgânicos.

As composições farmacêuticas incluem composições adequadas para administração oral, rectal, vias mucosais, transdérmica, parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intratecal e intravenosa), embora a via mais adequada em qualquer caso considerado esteja dependente da natureza e gravidade da patologia a ser tratada.

No caso onde é empregue uma composição de infusão ou injeção intravenosa, uma gama de dosagem adequada para utilização é, e. g., de cerca de 0,5 mg a cerca de 150 mg de dose diária total.

Além disso, o veículo do trióxido de arsénico pode ser distribuído via matrizes carregadas e não carregadas, utilizadas

como dispositivos de distribuição de fármaco, tais como membranas de acetato de celulose, também através de sistemas de distribuição direccionada, tal como lipossomas fusogénicos ligados a anticorpos ou antigénios específicos.

Na utilização prática, o trióxido de arsénico pode ser combinado como o ingrediente activo em mistura íntima com um veículo farmacêutico, de acordo com técnicas de composição farmacêutica convencionais. O veículo pode assumir uma grande variedade de formas dependendo da forma de preparação desejada para administração, e. g., oral ou parentérica (incluindo comprimidos, cápsulas, pós, injeções ou infusões intravenosas). Na preparação das composições para forma de dosagem oral, pode ser empregue qualquer um dos meios farmacêuticos convencionais, e. g., água, glicóis, óleos, álcoois, agentes aromatizantes, conservantes, agentes corantes e semelhantes; no caso de preparações líquidas orais, e. g., suspensões, elixires, lipossomas e aerossóis; amidos, açúcares, celulose microcristalina, diluentes, agentes de granulação, lubrificantes, ligandos, agentes de desintegração e semelhantes no caso de preparações sólidas orais e. g., pós, cápsulas e comprimidos. Na preparação das composições para forma de dosagem parentérica, tais como injeção ou infusão parentérica, podem ser empregues meios farmacêuticos semelhantes, e. g., água, glicóis, óleos, tampões, açúcar, conservantes e semelhantes conhecidos pelo especialista na técnica. Exemplos de tais composições parentéricas incluem, mas não estão limitadas a Dextrose a 5% p/v, solução salina normal e outras soluções. A dose total de trióxido de arsénico pode ser administrada num frasco de fluido intravenoso, e. g., variando de cerca de 2 mL a cerca de 2000 mL. O volume do fluido de diluição irá variar de acordo com a dose total administrada.

5.2. Cancros Alvo

Os cancros que podem ser tratados pelos métodos descritos incluem, neuroblastoma e retinoblastoma.

6. EXEMPLOS DE REFERÊNCIA

As seguintes subsecções descrevem o teste de uma composição farmacêutica compreendendo trióxido de arsénico *in vitro*, utilizando um painel de linhas celulares de cancro empregues pelo National Cancer Institute (NCI). Os resultados demonstram que o trióxido de arsénico é eficaz na inibição do crescimento de uma vasta gama de células de leucemia e células de cancro *in vitro*.

6.1. MÉTODOS E MATERIAIS

O trióxido de arsénico (1 mg/mL, 10 mg/ampola, preparado por Taylor Pharmaceuticals, Decatur, Illinois) foi testado a cinco concentrações, cada uma em diluição de 10 vezes, *i. e.*, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , e 10^{-9} µg/mL.

Os testes *in vitro* foram efectuados por incubação das células de teste na presença da concentração individual de trióxido de arsénico sob condições de cultura convencionais, durante um período de tempo designado, que é seguido por uma ensaio de proteína sulforodamina B (SRB) para estimar a viabilidade ou crescimento celular. As linhas celulares são

organizadas em subpanéis de acordo com a origem das linhas celulares, e. g., leucemia, cancro da mama, etc. Uma descrição das linhas celulares e método do teste é descrita em Monk *et al.* (1997, *Anticancer Drug Des.* 12:533-41) e Weinstein *et al.*, (1997, *Science* 275:343-9).

De seguida são descritos os processos de análise e apresentação de dados.

A determinação de um efeito é expressa em Percentagem de Crescimento (PG). O efeito determinado do composto numa linha celular é calculado de acordo com uma das duas seguintes expressões:

Se $(OD_{\text{teste}} \text{ Média} - OD_{\text{zero}} \text{ Média}) \geq 0$, então

$$PG = 100 \times (OD_{\text{teste}} \text{ Média} - OD_{\text{zero}} \text{ Média}) / (OD_{\text{controle}} \text{ Média} - OD_{\text{zero}} \text{ Média})$$

Se $(OD_{\text{teste}} \text{ Média} - OD_{\text{zero}} \text{ Média}) < 0$, então

$$PG = 100 \times (OD_{\text{teste}} \text{ Média} - OD_{\text{zero}} \text{ Média}) / OD_{\text{zero}} \text{ Média}$$

onde:

$OD_{\text{zero}} \text{ Média}$ = a média das determinações da densidade óptica da cor derivada da SRB, imediatamente antes da exposição das células aos compostos de teste;

$OD_{\text{teste}} \text{ Média}$ = a média das determinações da densidade óptica da cor derivada da SRB após a exposição das células aos compostos de teste durante um período de tempo designado; e

OD_{ctrl} Média = a média das determinações da densidade óptica da cor derivada da SRB após nenhuma exposição das células aos compostos de teste durante um período de tempo designado;

A Tabela 1 e 2 mostram os dados experimentais recolhidos contra cada linha celular. As primeiras duas colunas descrevem o subpainel (e. g., leucemia) e linha celular envolvida (e. g., CCRF-CEM). As seguintes duas colunas indicam a OD_{zero} Média e OD_{ctrl} Média; as cinco colunas seguintes mostram a OD_{teste} Média para cada uma de cinco concentrações diferentes. Cada concentração é expressa como o log₁₀ (molar ou µg/mL). As cinco colunas seguintes indicam a PG calculada para cada concentração. Os parâmetros de resposta GI50, TGI e LC50 são valores interpolados representando as concentrações às quais a PG é +50, 0, e -50, respectivamente. Algumas vezes estes parâmetros de resposta não podem ser obtidos por interpolação. Se, por exemplo, todas as PG numa determinada fila excedem +50, então, nenhum dos três parâmetros pode ser obtido por interpolação. Em tal caso, os valores apresentados para o parâmetro de resposta é a concentração testada mais elevada e é precedido por um sinal ">". Esta prática estende-se, de um modo semelhante, a outras situações possíveis onde não pode ser obtido um parâmetro de resposta por interpolação.

É obtida uma curva de dose-resposta (ver Figuras 1A-1I e 3A-3I) para o conjunto de dados, ao representar graficamente as PG em função da log₁₀ da concentração correspondente para cada linha celular. As curvas das linhas celulares são agrupadas por subpainel. As linhas horizontais são proporcionadas para o valor de PG de +50, 0 e -50. As concentrações correspondentes aos

pontos onde as curvas interceptam estas linhas são o GI50, TGI e LC50, respectivamente.

Um gráfico da média (Figuras 2 e 4) facilita a análise visual dos dados para potenciais padrões de selectividade para linhas celulares particulares ou para subpainéis particulares no que se refere a um parâmetro de resposta seleccionado. As diferenças nos aparentes padrões de selectividade podem correr para o mesmo composto contra as mesmas linhas celulares, quando são comparados diferentes parâmetros. A página dos gráficos da média do conjunto de dados mostra os gráficos da média a cada um dos principais parâmetros de resposta: GI50, TGI, e LC50. As barras que se prolongam para a direita representam a sensibilidade da linha celular para o agente de teste em excesso da sensibilidade média de todas as linhas celulares testadas. Uma vez que a escala da barra é logarítmica, uma barra com 2 unidades para a direita implica que o composto atinge o parâmetro de resposta (e. g., GI50) para a linha celular a uma concentração cem vezes a concentração média necessária em relação a todas as linhas celulares e, deste modo, a linha celular é anormalmente sensível a esse composto. Consequentemente, as barras que se prolongam para a esquerda implicam menos sensibilidade que a média. Se para um fármaco e linha celular em particular não foi possível determinar o parâmetro de resposta desejado por interpolação, o comprimento da barra apresentado é a concentração testada mais elevada (e o $\log_{10}$ listado do parâmetro de resposta será precedido por um ">") ou a concentração testada mais baixa (e o $\log_{10}$ listado será precedido por um "<").

O valor em qualquer um dos limites (> ou <) é também calculado na média utilizada para o gráfico da média. Deste

modo, a média utilizada no gráfico da média pode não ser, por exemplo, a média verdadeira do GI50. Por esta razão, este valor é referido como a MG_MID (para o ponto central do gráfico da média).

6.2. RESULTADOS

Os resultados dos dois conjuntos de testes são apresentados abaixo. No primeiro conjunto, as células de 56 linhas celulares de cancro diferentes foram expostas, continuamente, a cinco concentrações de trióxido de arsénico durante dois dias antes de efectuar o ensaio de SRB. No segundo conjunto, as células de 50 linhas celulares diferentes (um subconjunto das primeiras 56 linhas celulares, mais a linha celular de cancro renal 786-0) foram expostas, continuamente, durante seis dias antes do ensaio de SRB.

TABELA 1

	Log 10 Concentração														
	Densidades Ópticas Médias												Porcentagem de Crescimento		
	Tempo	Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9-	6,9	5,9	-4,9	G150	TGI	LC50
	Zero														
Leucemia															
CCRF-CEM	0,300	1,155	1,203	1,195	1,134	0,704	0,285	106	105	98	47	-5	1,11E-06	1,00E-05 >	> 1,26E-05
HL-60(TB)	0,233	0,530	0,533	0,507	0,535	0,499	0,213	101	92	102	90	-9	3,19E-06	1,03E-05 >	> 1,26E-05
K-562	0,209	1,416	1,387	1,431	1,418	1,124	0,199	98	101	100	76	-5	2,63E-06	1,10E-05 >	> 1,26E-05
MOLT-4	0,134	0,438	0,465	0,454	0,454	0,368	0,146	109	105	105	77	4	2,96E-06	> 1,26E-05 >	> 1,26E-05
RPMI-8226	0,257	0,893	0,868	0,848	0,813	0,670	0,204	96	93	87	65	-21	1,88E-06	7,23E-06 >	> 1,26E-05
SR	0,158	0,457	0,454	0,425	0,457	0,338	0,111	99	89	100	60	-30	1,63E-06	5,85E-06 >	> 1,26E-05
Cancro das Células Não Pequenas do Pulmão															
A549/ATCC	0,015	0,477	0,479	0,486	0,476	0,516	0,336	100	102	100	108	69	> 1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05
EKVX	0,342	0,736	0,809	0,849	0,841	0,853	0,385	119	129	127	130	11	5,91E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
HOP-62	0,335	1,109	1,088	1,099	1,113	1,086	0,605	97	99	100	97	35	7,18E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
HOP-92	0,505	1,694	1,554	1,603	1,477	1,381	0,873	88	92	82	74	31	4,50E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NC1-H226	0,560	0,932	0,967	0,918	0,967	0,967	0,904	109	96	109	109	92	> 1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NC1-H23	0,648	1,622	1,769	1,822	1,880	1,635	1,215	115	121	127	101	58	> 1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NC1-8322M	0,382	0,997	1,103	1,036	0,976	0,992	0,755	117	106	97	99	61	> 1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NC1-H460	0,296	1,235	1,132	1,186	1,234	1,157	0,757	89	95	100	92	49	1,20E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NC1-H522	0,478	1,138	1,332	1,135	1,189	0,892	0,378	129	100	108	63	-21	1,79E-06	7,08E-06	> 1,26E-05

TABELA 1 (continuação)

		Log 10 Concentração														
		Densidades Ópticas Médias						Porcentagem de Crescimento								
	Tempo	Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9-	6,9	5,9	-4,9	G150	TGI	LC50	
Zero																
Cancro do Cólon																
COLO 205	0,328	1,394	1,425	1,414	1,576	1,434	0,935	103	102	117	104	57	>1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
HCT-116	0,301	1,574	1,508	1,480	1,488	1,391	0,685	95	93	93	86	30	5,53E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
HCT-15	0,219	1,623	1,800	1,627	1,673	1,522	0,504	113	100	104	93	20	4,90E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
HT29	0,095	0,578	0,637	0,599	0,580	0,479	0,169	112	104	100	80	15	3,63E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
KM12	0,189	0,741	0,744	0,728	0,777	0,737	0,567	101	98	106	99	68	>1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SW-620	0,153	0,886	0,898	0,868	0,857	0,779	0,267	102	98	96	85	16	4,05E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
Cancro do SNC																
SF-268	0,203	0,767	0,821	0,736	0,815	0,767	0,334	110	94	108	100	23	5,63E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SF-295	0,249	1,007	0,951	0,978	0,938	0,938	0,639	93	96	91	91	51	>1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SF-539	0,132	0,462	0,491	0,516	0,506	0,435	0,110	109	117	113	92	-17	3,06E-06	8,85E-06	> 1,26E-05	
SNB-19	0,176	0,905	0,857	0,880	0,887	0,883	0,437	93	97	98	97	36	7,38E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SNB-75	0,501	1,051	0,925	1,049	1,134	0,703	0,438	77	100	115	37	-13	8,54E-07	6,98E-06	> 1,26E-05	
U251	0,192	0,799	0,789	0,792	0,803	0,680	0,061	98	99	101	80	-68	2,02E-06	4,37E-06	9,47E-06	
Melanoma																
LOX IMVI	0,173	1,304	1,175	1,170	0,974	0,997	0,319	89	88	71	73	13	3,03E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
MALME-3M	0,476	0,859	1,006	0,949	0,868	0,819	0,275	138	123	102	90	-42	2,51 E-06	6,02E-06	> 1,26E-05	
M14	0,123	0,613	0,602	0,635	0,592	0,549	0,136	98	105	96	87	3	3,45E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SK-MEL-2	0,388	0,704	0,746	0,714	0,735	0,676	0,323	113	103	110	91	-17	3,03E-06	8,81E-06	> 1,26E-05	
SK-MEL-28	0,513	1,090	1,088	1,107	1,093	1,057	0,546	100	103	101	94	6	3,98E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SK-MEL-5	0,454	2,107	2,049	2,066	2,025	1,748	0,460	96	97	95	78	0	2,90E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
UACC-257	0,596	1,142	1,149	1,128	1,165	1,078	0,814	101	97	104	88	40	7,78E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
UACC-62	0,306	1,082	1,111	1,105	1,108	1,051	0,355	104	103	103	96	6	4,10E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	

TABELA 1 (continuação)

	Tempo	Log 10 Concentração												G150	TGI	LC50
		Densidades Ópticas Médias						Porcentagem de Crescimento								
		Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9-	6,9	5,9	-4,9				
Zero																
Cancro dos Ovários																
IGROV1	0,291	1,679	1,828	1,932	1,743	1,710	0,536	111	118	105	102	18	5,22E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
OVCAR-3	0,240	1,066	1,073	1,055	1,045	0,980	0,343	101	99	97	90	12	4,10E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
OVCAR-5	0,457	1,206	1,243	1,230	1,157	1,181	0,715	105	103	93	97	34	7,07E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
OVCAR-8	0,173	1,340	1,250	1,245	1,159	1,107	0,495	92	92	84	80	28	4,71E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SK-OV-3	0,351	0,865	0,836	0,852	0,853	0,867	0,557	94	97	98	100	40	8,59E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
Cancro Renal																
A498	0,400	0,678	0,691	0,657	0,649	0,635	0,357	105	93	89	84	-11	2,90E-06	9,71E-06	> 1,26E-05	
CAKI-1	0,372	0,942	1,058	0,960	1,103	0,819	0,325	120	103	128	78	-13	2,59E-06	9,13E-06	> 1,26E-05	
RXE 393	0,743	1,243	0,860	1,114	1,290	1,077	0,776	23	74	109	67	7		> 1,26E-05	> 1,26E-05	
SN12C	0,157	0,546	0,533	0,529	0,500	0,474	0,113	97	96	88	81	-28	1,44E-06	6,96E-06	> 1,26E-05	
TX-10	0,355	1,027	1,014	1,002	1,042	0,999	0,727	98	96	102	96	55	>1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
UO-31	0,124	0,765	0,799	0,816	0,830	0,785	0,391	105	108	110	103	42	9,20E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
Cancro da Próstata																
PC-3	0,187	0,419	0,426	0,399	0,390	0,342	0,179	103	91	88	67	-4	2,17E-06	1,10E-05	> 1,26E-05	
DU-145	0,384	1,151	1,081	1,389	1,194	1,119	0,873	91	131	106	96	64	>1,26E-05	> 1,26E-05	> 1,26E-05	

TABELA 1 (continuação)

Log 10 Concentração																
		Densidades Ópticas Médias						Porcentagem de Crescimento								
Tempo	Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9-	6,9	5,9	-4,9	G150	TGI	LC50		
Zero																
Cancro da Mama																
MCF7	0,200	0,928	0,924	0,912	0,985	0,893	0,277	99	98	108	95	11	4,31E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
NCI/ADR-RES	0,328	1,396	1,576	1,376	1,425	1,298	0,801	118	99	104	92	45	9,69E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
MDA-MB-	0,304	0,644	0,635	0,651	0,674	0,667	0,314	97	102	109	107	3	4,43E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
231/ATCC																
HS 578T	0,369	1,255	1,338	1,296	1,219	1,300	0,742	109	105	96	105	42	9,44E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
MDA-MB-435	0,465	1,425	1,370	1,354	1,476	1,369	0,666	94	93	105	94	21	5,05E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
MDA-N	0,348	1,471	1,499	1,481	1,374	1,316	0,385	102	101	91	86	3	3,44E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
BT-549	0,735	1,762	1,910	1,865	1,847	1,599	0,998	114	110	108	84	26	4,82E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
T-47D	0,464	1,007	0,941	1,054	1,184	0,905	0,419	88	109	133	81	-10	2,78E-06	9,86E-06	> 1,26E-05	

No primeiro conjunto de testes, de acordo com a Tabela 1 e as curvas de resposta-dose, como apresentado na Figura 1A a 1I, o trióxido de arsénico foi eficaz na redução do crescimento celular contra quase todas as linhas celulares testadas. Em particular, as linhas celulares de leucemia, linhas celulares de melanoma e linhas celulares de cancro dos ovários responderam consistentemente, ao apresentar uma redução de crescimento de mais de 50%. De acordo com o gráfico da média, como apresentado na Figura 2, a maioria das linhas celulares de leucemia e melanoma, linhas celulares de cancro do sistema nervoso central SNB-75 e U251, linha celular do cancro da próstata PC-3, linhas celulares de cancro renal A498, CAKI-1, SN12C e linha celular do cancro do pulmão NCI-H522, foram especialmente sensíveis (relativamente a todas as linhas celulares testadas) ao tratamento com trióxido de arsénico.

TABELA 2

Log 10 Concentração															
		Densidades Ópticas Médias										Percentagem de Crescimento			
Painel/Linha	Tempo	Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	G150	TGI	LC50
Celular	Zero														
Leucemia															
CCRF-CEM	0,047	3,511	3,601	3,592	3,051	0,320	0,048	103	102	87	8	0	3,68E-07	> 1,26E-05	> 1,26E-05
K-562	0,041	3,011	3,042	2,992	3,360	2,931	0,096	101	99	112	97	2	3,94E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
MOLT-4	0,018	0,503	0,554	0,228	0,432	0,245	0,113	111	43	85	47	20		> 1,26E-05	> 1,26E-05
RPMI-8226	0,066	1,432	1,607	1,263	1,423	0,368	0,065	113	88	99	22	-2	5,48E-07	1,09E-05	> 1,26E-05
Cancro das Células Não Pequenas do Pulmão															
EKVX	0,030	0,682	0,573	0,601	0,628	0,414	0,014	83	88	92	59	-53	1,51E-06	4,22E-06	1,18E-05
HOP-62	0,061	1,026	1,076	0,997	1,019	0,451	0,014	105	97	99	40	-77	8,66E-07	2,78E-06	7,41E-06
HOP-92	0,115	1,292	1,455	1,834	1,319	1,229	0,079	114	146	102	95	-31	2,85E-06	7,11E-06	> 1,26E-05
NCI-H226	0,094	0,498	0,504	0,458	0,489	0,348	0,164	101	90	98	63	17	2,40E-08	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NCI-H23	0,075	1,624	1,818	1,814	1,872	1,303	0,086	113	112	116	79	1	2,97E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NCI-H322M	0,035	0,702	0,680	0,620	0,674	0,552	0,054	97	88	96	77	3	2,94E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NCI-H460	0,034	2,839	2,797	2,806	2,792	2,535	0,062	99	99	98	89	1	3,50E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
NCI-H522	0,175	1,224	1,269	0,535	1,191	0,128	0,028	104	34	97	-27	-84		7,64E-07	3,19E-06
Cancro do Cólon															
COLO 205	0,022	2,351	2,308	2,026	2,283	1,404	0,024	98	86	97	59	0	1,81E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
													>1,26E-		
HCT-116	0,046	3,420	3,395	3,289	3,381	3,284	1,931	99	96	99	96	56	05	> 1,26E-05	> 1,26E-05
HCT-15	0,033	3,838	3,965	3,921	4,227	3,432	0,404	103	102	110	89	10	3,93E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
HT29	0,017	3,060	3,189	2,988	2,706	1,476	0,027	104	98	88	48	0	1,12E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05
KM12	0,012	0,808	0,487	0,533	0,507	0,036	0,017	80	87	83	4	1	3,29E-07	> 1,26E-05	> 1,26E-05
SW-620	0,023	2,652	2,613	2,308	2,337	1,475	0,007	99	87	88	55	-72	1,39E-06	3,43E-06	8,50E-06

TABELA 2 (continuação)

		Log 10 Concentração														
		Densidades Ópticas Médias						Porcentagem de Crescimento								
Painel/Linha	Tempo	Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	G150	TGI	LC50	
Celular	Zero															
Cancro do SNC																
SF-268	0,054	0,798	0,990	0,381	0,356	0,387	-0,004	126	44	41	45	-100	1,06E-08	2,57E-06	5,69E-06	
SF-295	0,031	1,324	1,284	1,279	1,244	0,659	0,010	97	97	94	49	-69	1,17E-06	3,25E-06	8,64E-06	
SF-539	0,041	1,398	1,727	1,403	1,545	0,691	0,017	108	87	97	42	-59	8,91E-07	3,29E-06	1,04E-05	
SNB-75	0,134	1,063	1,143	1,033	1,024	0,815	0,028	108	97	96	73	-79	1,79E-06	3,80E-06	8,08E-06	
U251	0,105	2,324	2,129	2,018	1,908	0,088	-0,012	91	86	81	-17	-100	2,63E-07	8,51E-07	3,16E-06	
Melanoma																
LOX IMV1	0,013	2,153	2,000	1,666	0,053	0,002	-0,001	93	77	2	-88	-100	2,90E-08	1,32E-07	4,73E-07	
MALMI-3M	0,115	0,650	0,702	0,595	0,823	0,383	0,005	110	90	132	50	-96	1,26E-06	2,78E-06	6,12E-06	
SK-MEL-2	0,213	0,500	0,491	0,462	0,426	0,128		97	87	74	-40	-100	2,06E-07	5,63E-07	1,85E-06	
SK-MEL-28	0,093	2,030	2,012	1,906	1,797	0,488		99	94	88	20	-100	4,60E-07	1,86E-06	4,84E-06	
SK-MEL-5	0,181	1,907	1,935	1,864	1,929	1,846	0,013	102	97	101	96	-93	2,22E-06	4,07E-06	7,46E-06	
UACC-257	0,053	0,883	0,872	0,857	0,832	0,504	0,039	99	97	94	54	-27	1,42E-06	5,83E-06	> 1,26E-05	
UACC-62	0,030	1,537	1,546	1,460	1,409	0,539	0,001	101	95	92	34	-98	6,60E-07	2,27E-06	5,43E-06	
Cancro do Ovários																
IGROV1	0,335	3,115	3,541	3,056	3,204	2,877	0,216	115	98	103	91	-36	2,67E-06	6,62E-06	> 1,26E-05	
OVCAR-3	0,081	1,153	1,047	1,128	1,124	0,482	0,001	90	98	97	37	-99	7,76E-07	2,36E-06	5,49E-06	
OVCAR-5	0,038	1,404	1,433	1,460	1,478	1,287	0,028	102	104	105	91	-26	2,83E-06	7,53E-06	> 1,26E-05	
OVCAR-8	0,016	2,090	2,272	1,848	2,242	1,437	-0,001	109	88	107	68	-100	1,62E-06	3,21E-06	6,36E-06	
SK-OV-3	0,041	1,474	1,445	1,410	1,461	1,247	0,020	98	96	99	84	-51	2,25E-06	5,27E-06	1,23E-05	

TABELA 2 (continuação)

	Log 10 Concentração															
	Tempo	Densidades Ópticas Médias						Porcentagem de Crescimento								
Painel/Linha	Zero	Ctrl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	G150	TGI	LC50	
Celular																
Cancro Renal																
786-0	0,021	1,578	1,582	1,821	1,786	0,832	-0,003	100	116	113	52	-100	1,30E-06	2,77E-06	5,91E-06	
A498	0,051	0,741	0,826	0,764	0,837	0,558	0,025	112	103	114	73	-52	1,94E-06	4,85E-06	1,22E-05	
CAKI-1	0,032	1,352	1,254	1,725	1,573	0,491	0,004	93	128	117	35	-88	8,22E-07	2,43E-06	6,22E-06	
RXF 393	0,198	1,515	1,327	1,301	1,727	0,909	0,017	86	84	116	54	-91	1,34E-06	2,96E-06	6,54E-06	
S12C	0,024	0,956	0,882	1,141	1,113	0,829	0,013	92	120	117	86	-46	2,37E-06	5,67E-06	> 1,26E-05	
TK-10	0,072	1,333	1,356	1,268	1,334	1,103	0,239	102	95	100	82	13	3,66E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
Cancro da Próstata																
DU-145	0,095	2,158	2,147	1,954	1,935	2,153	0,055	99	90	89	100	-43	2,82E-06	6,32E-06	> 1,26E-05	
Cancro da Mama																
MCF7	0,028	2,650	2,647	2,611	2,603	1,683	0,008	100	99	98	63	-73	1,57E-06	3,66E-06	8,51E-06	
NCI/ADR-RIS	0,050	2,304	2,075	2,253	1,951	1,319	0,072	90	98	84	56	1	1,64E-06	> 1,26E-05	> 1,26E-05	
MDA-MB-231/A																
TCC	0,158	0,761	0,759	0,764	0,771	0,563	-0,001	100	101	102	67	-100	1,59E-06	3,18E-06	6,33E-06	
HS 578T	0,109	0,728	0,777	0,587	0,890	0,706	0,010	108	77	126	96	-91	2,23E-06	4,12E-06	7,62E-06	
MDA-MB-435	0,054	1,500	1,276	1,470	0,865	0,631	0,021	85	98	56	40	-62	3,00E-07	3,10E-06	9,60E-06	
MDA-N	0,028	2,652	2,468	2,616	2,606	1,738	0,026	93	99	98	65	-9	2,02E-06	9,55E-06	> 1,26E-05	
BT-549	0,112	1,798	1,876	1,940	1,963	1,697	0,018	105	108	110	94	-84	2,22E-06	4,24E-06	8,08E-06	
T-47D	0,098	0,824	0,883	0,336	0,539	0,398	0,027	108	33	61	41	-73		2,90E-06	7,93E-06	

No segundo conjunto de testes, de acordo com a Tabela 2, as curvas de resposta-dose e o gráfico da média como apresentado na Figura 3A a 1I e Figura 4, o trióxido de arsénico foi eficaz na redução do crescimento celular contra quase todas as linhas celulares testadas. Os resultados foram consistentes com os obtidos pelo primeiro conjunto de testes. Em particular, várias linhas celulares de melanoma pareceram ser especialmente sensíveis aos vários parâmetros de resposta principais.

Em conclusão, estes resultados demonstram que o trióxido de arsénico é eficaz na inibição do crescimento de células de leucemia e células de cancro *in vitro* e que o trióxido de arsénico pode ser utilizado em indivíduos humanos para tratar uma vasta gama de leucemias e cancros, incluindo, mas não limitada a, cancro das células não pequenas do pulmão, cancro do cólon, cancro do sistema nervoso central, melanoma, cancro dos ovários, cancro renal, cancro da próstata e cancro da mama.

Lisboa, 24 de Outubro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de trióxido de arsénico na preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor do sistema nervoso central, seleccionado do grupo consistindo de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma e oligodendroglioma.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o trióxido de arsénico é formulado como uma solução iónica.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o trióxido de arsénico está numa forma adaptada para a administração de cerca de 10 µg a cerca de 200 mg por dia.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o trióxido de arsénico está numa forma adaptada para a administração de cerca de 0,5 mg a cerca de 70 mg por dia.
5. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o trióxido de arsénico está numa forma adaptada para administração parentérica.
6. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o trióxido de arsénico está numa forma adaptada para administração intravenosa.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o trióxido de arsénico está numa forma adaptada para a administração de cerca de 0,5 mg a cerca de 150 mg por dia.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento compreende, adicionalmente, uma quantidade eficaz de, pelo menos, um outro agente terapêutico.
9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o outro agente terapêutico é um quimioterapêutico.
10. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o outro agente terapêutico é seleccionado do grupo consistindo de etoposido, cisplatina, carboplatina, fosfato de estramustina, vinblastina, metotrexato, hidroxiureia, ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, taxol, dietilstilbestrol, VM-26(vumon), BCNU, ácido retinóico all-trans, procarbazina, citocinas, vacinas terapêuticas e imunomoduladores.

Lisboa, 24 de Outubro de 2008

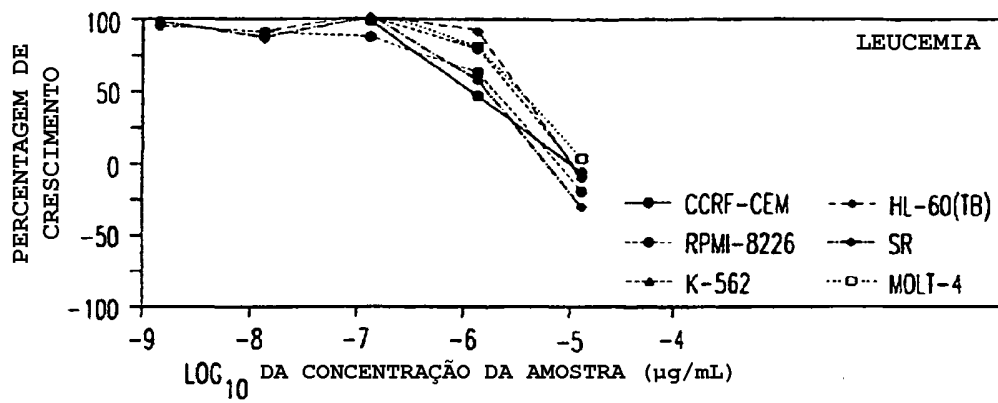


FIG.1A

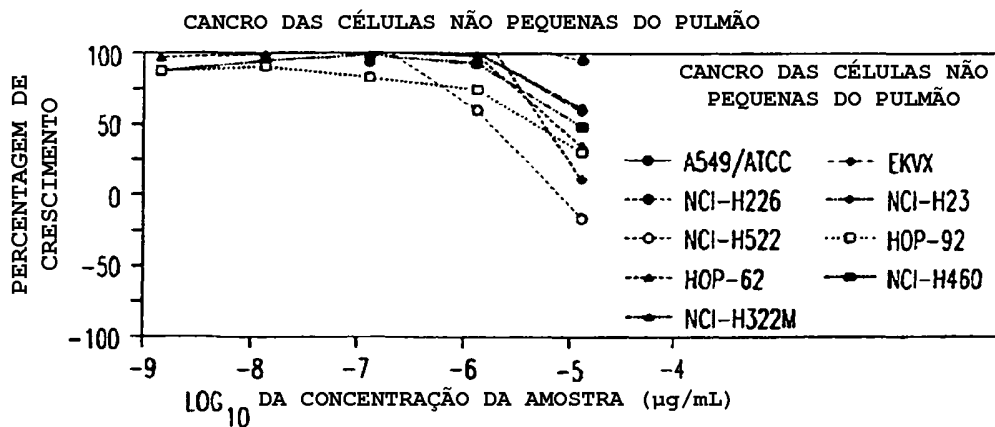


FIG.1B

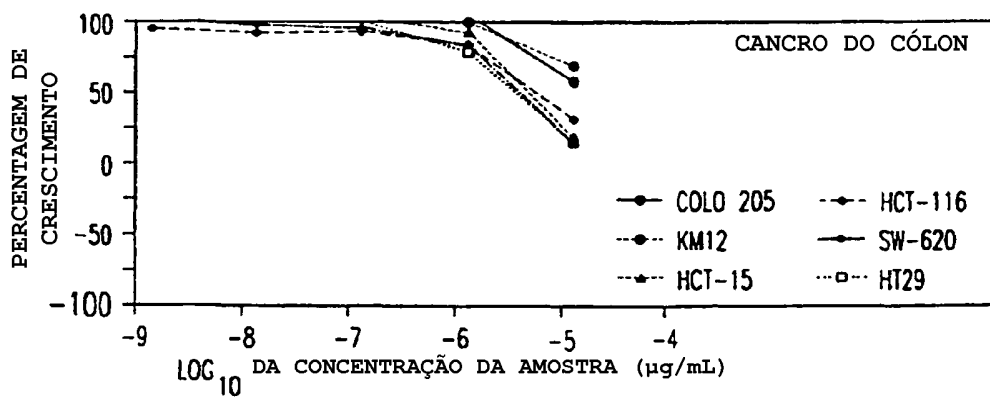


FIG.1C

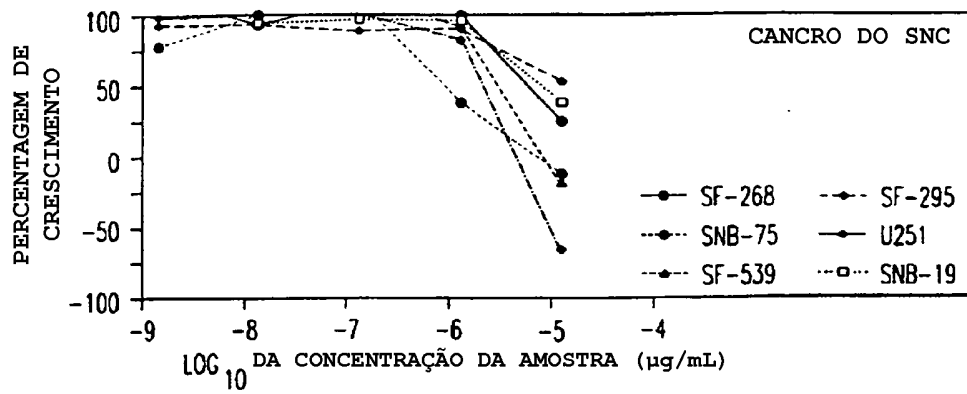


FIG.1D

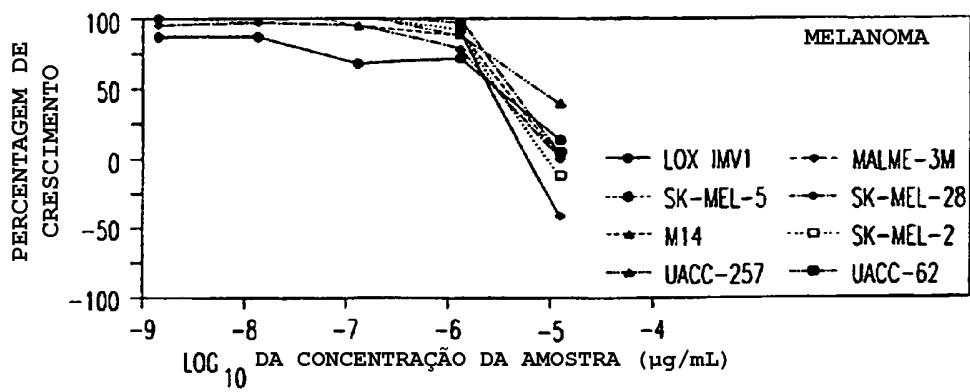


FIG.1E

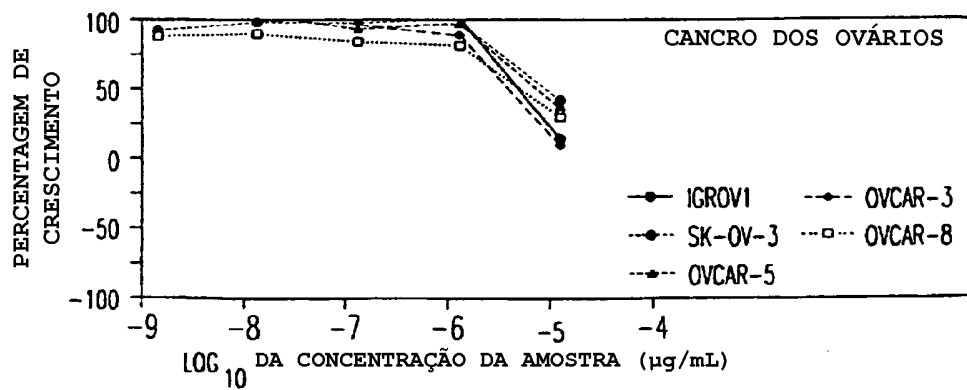


FIG.1F

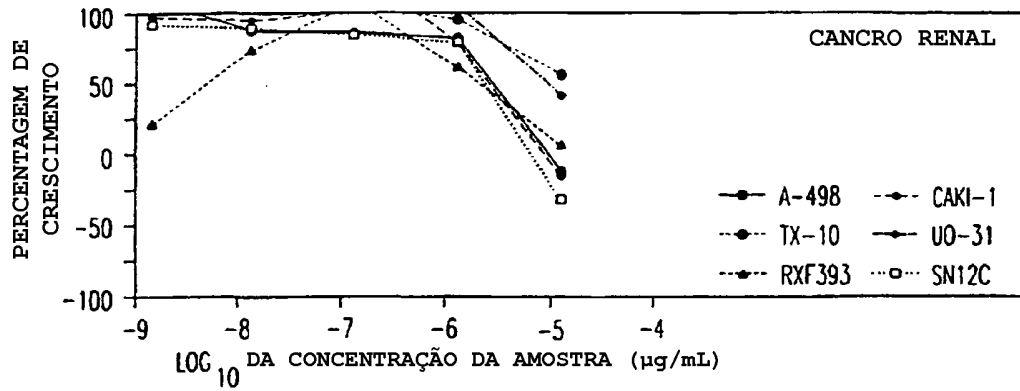


FIG.1G

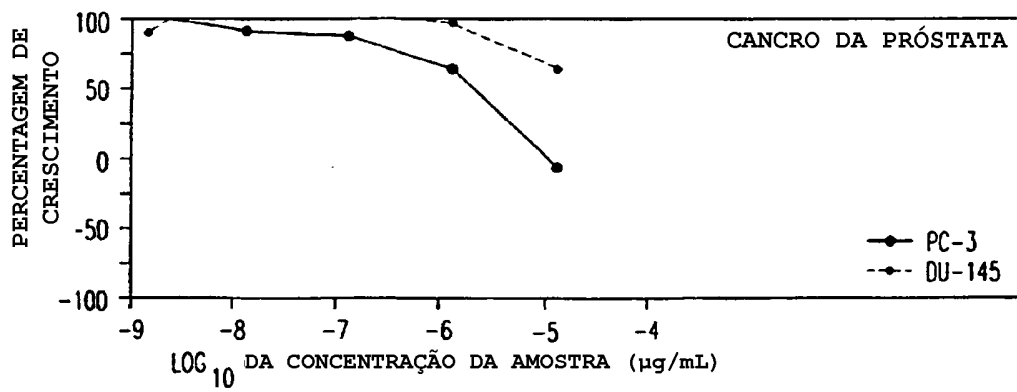


FIG.1H

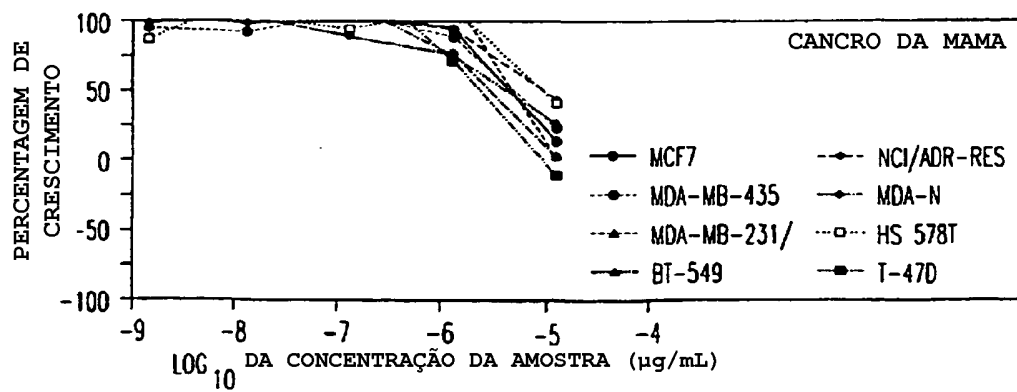


FIG.1I

GRÁFICOS DA MÉDIA

PAINEL/LINHA CELULAR	LOG ₁₀ G150	G150	LOG ₁₀ TGI	TGI	LOG ₁₀ LC50	LC50
LEUCEMIA						
CCRF-CHM	-5,95	■	-5,00	■	> -4,90	
HL-60(T8)	-5,50	■	-4,99	■	> -4,90	
K-562	-5,58	■	-4,96	■	> -4,90	
MOLT-4	-5,53	■	> -4,90	■	> -4,90	
RPMI-8226	-5,73	■	-5,14	■	> -4,90	
SR	-5,79	■	-5,23	■	> -4,90	
CANCRO DAS CÉLULAS NÃO PEQUENAS DO PULMÃO						
A549/ATCC	> -4,90	■	> -4,90	■	> -4,90	
ERXX	-5,23	■	> -4,90	■	> -4,90	
HOP-62	-5,14	■	> -4,90	■	> -4,90	
HOP-92	-5,35	■	> -4,90	■	> -4,90	
NCI-H226	> -4,90	■	> -4,90	■	> -4,90	
NCI-H23	> -4,90	■	> -4,90	■	> -4,90	
NCI-H322M	> -4,90	■	> -4,90	■	> -4,90	
NCI-H460	-4,92	■	> -4,90	■	> -4,90	
NCI-H522	-5,75	■	-5,15	■	> -4,90	
CANCRO DO CÓLON						
COLO 205	> -4,90	■	> -4,90	■	> -4,90	
HCT-116	-5,26	■	> -4,90	■	> -4,90	
HCT-15	-5,31	■	> -4,90	■	> -4,90	
HT29	-5,44	■	> -4,90	■	> -4,90	
KM12	> -4,90	■	> -4,90	■	> -4,90	
SW-620	-5,39	■	> -4,90	■	> -4,90	

CONTINUAÇÃO NA FIG. 2B
FIG. 2A

CONTINUAÇÃO DA FIG. 2A
GRÁFICOS DA MÉDIA

PAINEL/LINHA CELULAR	LOG ₁₀ C150	C150	LOG ₁₀ TGI	TGI	LOG ₁₀ LC50	LC50
CANCRO DO SNC						
SF-208	-5,25		> -4,90		> -4,90	
SF-295	> -4,90		> -4,90		> -4,90	
SF-539	-5,51		-5,05		> -4,90	
SNB-19	-5,13		> -4,90		> -4,90	
SNB-75	-6,07		-5,16		> -4,90	
U251	-5,69		-5,36		-5,02	
MELANOMA						
LOX IMV1	-5,52		> -4,90		> -4,90	
MALME-3M	-5,60		-5,22		> -4,90	
M14	-5,46		> -4,90		> -4,90	
SK-MEL-2	-5,52		-5,06		> -4,90	
SK-MEL-28	-5,40		> -4,90		> -4,90	
SK-MEL-5	-5,54		> -4,90		> -4,90	
UACC-257	-5,11		> -4,90		> -4,90	
UACC-62	-5,39		> -4,90		> -4,90	
CANCRO DOS OVÁRIOS						
IGROV1	-5,28		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-3	-5,39		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-5	-5,15		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-8	-5,33		> -4,90		> -4,90	
SK-OV-3	-5,07		> -4,90		> -4,90	

CONTINUAÇÃO NA FIG. 2C
FIG. 2B

CONTINUAÇÃO DA FIG. 2B
GRÁFICOS DA MÉDIA

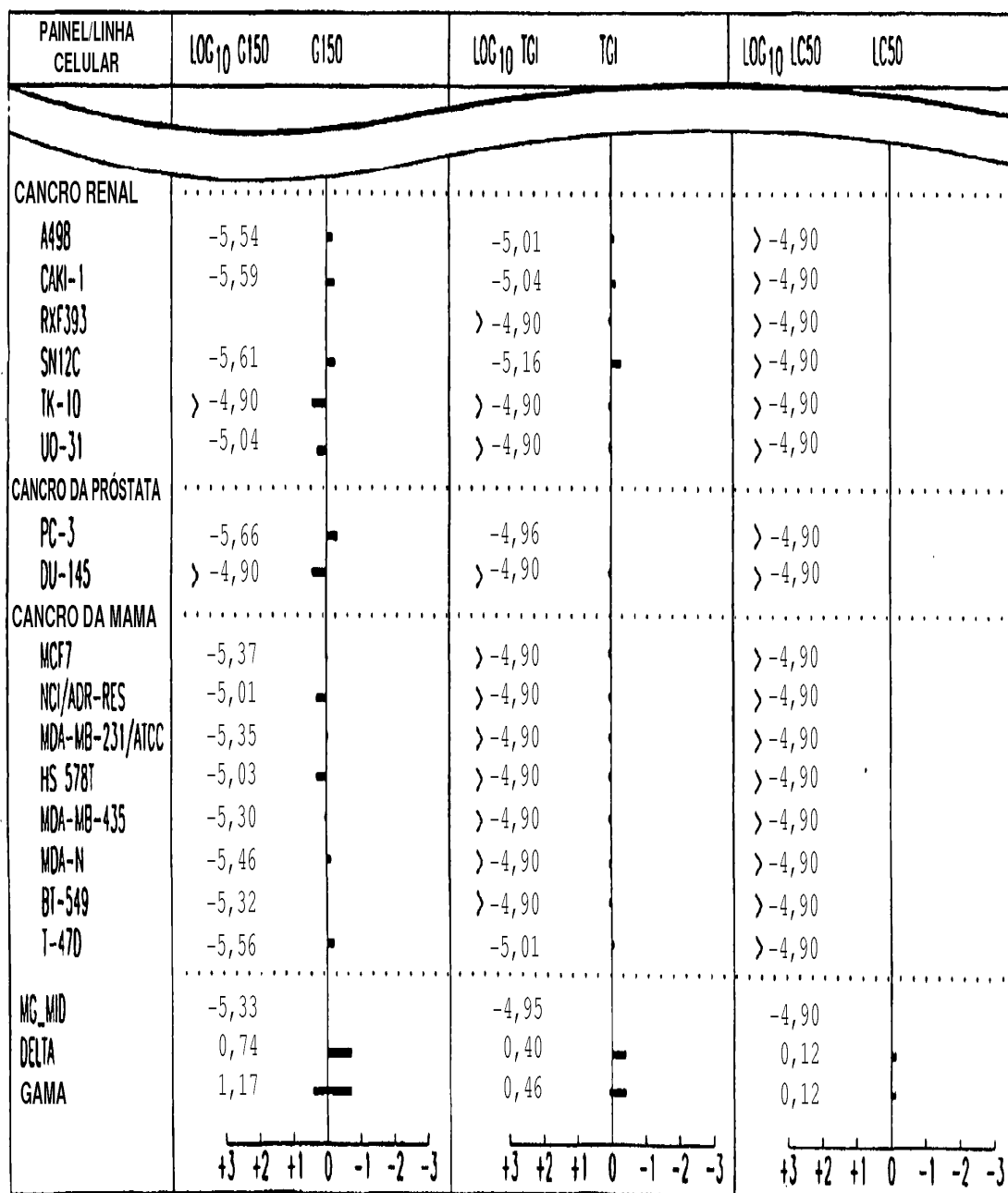


FIG. 2C

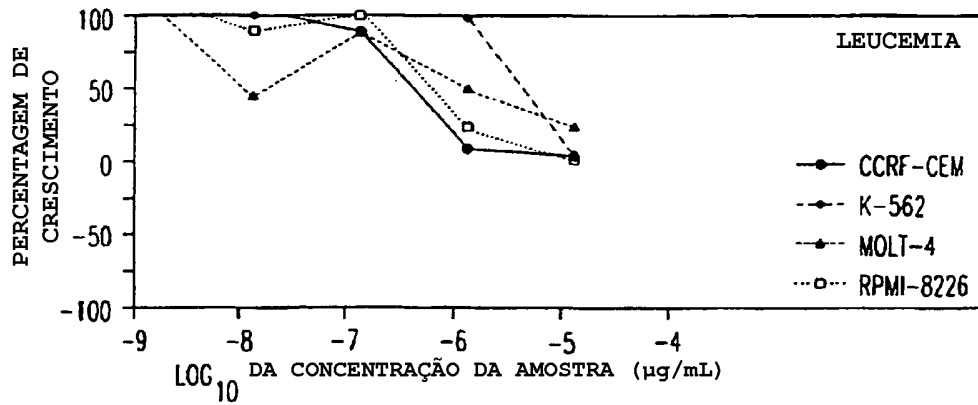


FIG.3A

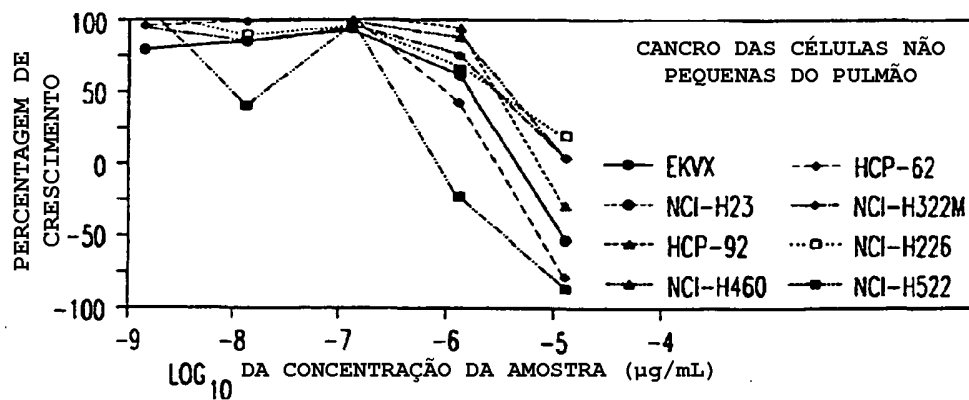


FIG.3B

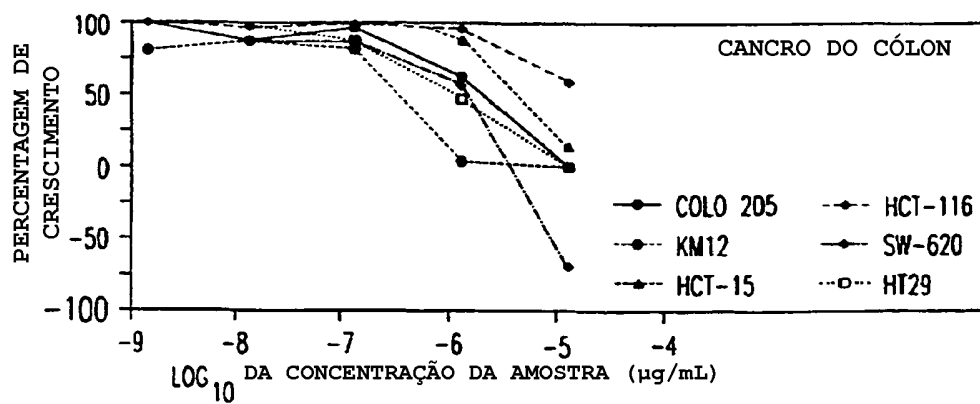


FIG.3C

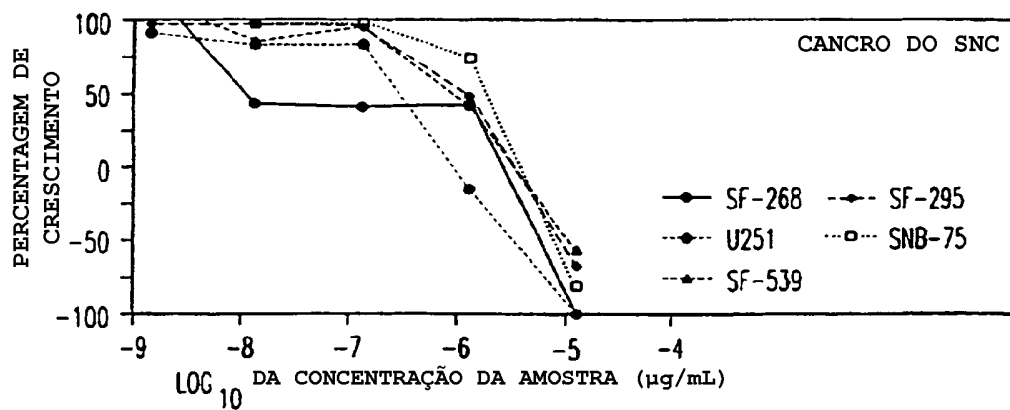


FIG.3D

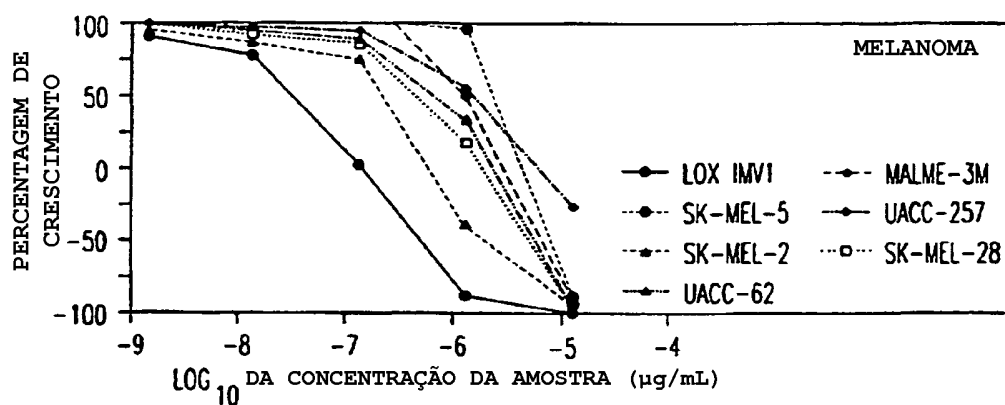


FIG.3E

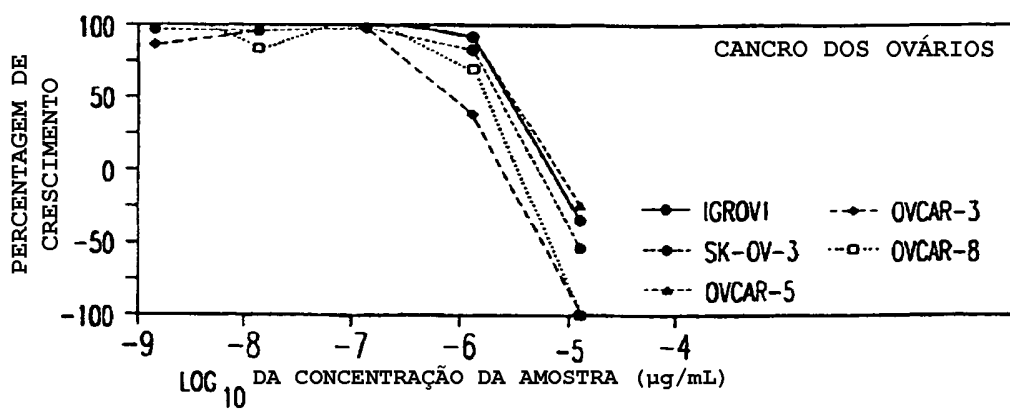


FIG.3F

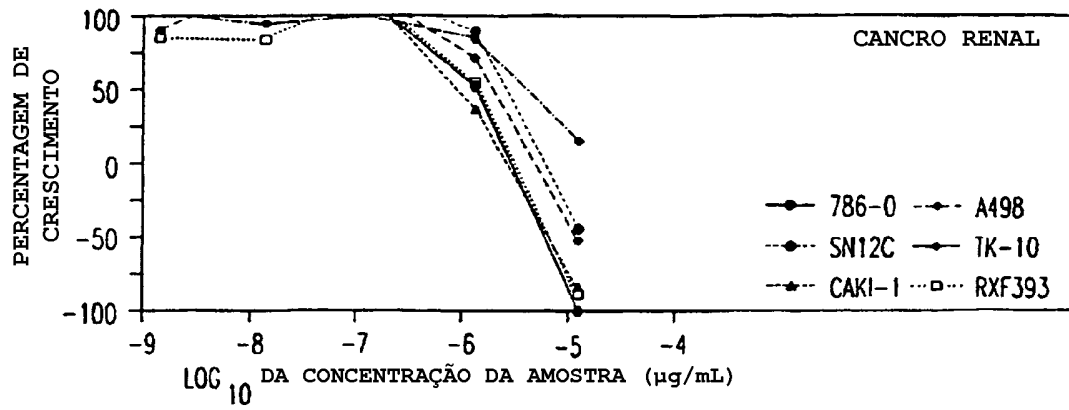


FIG.3G

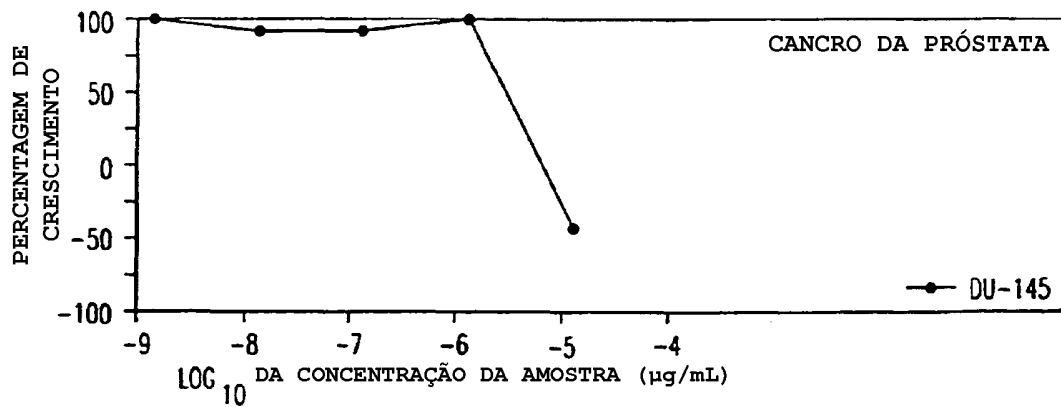


FIG.3H

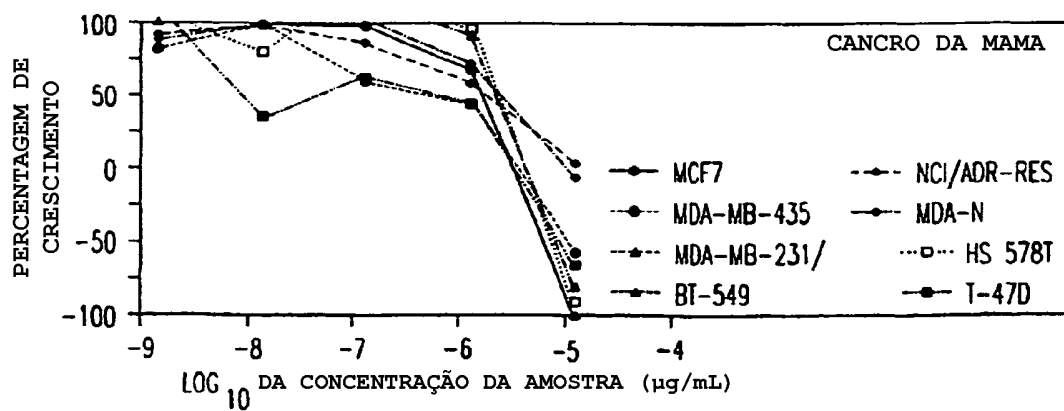


FIG.3I

GRÁFICOS DA MÉDIA

PAINEL/LINHA CELULAR	LOG ₁₀ G150	G150	LOG ₁₀ TGI	TGI	LOG ₁₀ LC50	LC50
LEUCEMIA						
CCRF-CHM	-6,43		> -4,90		> -4,90	
K-562	-5,40		> -4,90		> -4,90	
MOLT-4			> -4,90		> -4,90	
RPMI-8226	-6,26		-4,96		> -4,90	
CANCRO DAS CÉLULAS NÃO PEQUENAS DO PULMÃO						
EXVX	-5,82		-5,37		-4,90	
HOP-62	-6,06		-5,56		-5,13	
HOP-92	-5,55		-5,15		> -4,90	
NCI-H226	-5,62		> -4,90		> -4,90	
NCI-H23	-5,53		> -4,90		> -4,90	
NCI-H322M	-5,53		> -4,90		> -4,90	
NCI-H460	-5,46		> -4,90		> -4,90	
NCI-H522			-6,12		-5,50	
CANCRO DO CÓLON						
COLO 205	-5,74		> -4,90		> -4,90	
HCT-116	> -4,90		> -4,90		> -4,90	
HCT-15	-5,41		> -4,90		> -4,90	
HT29	-5,95		> -4,90		> -4,90	
KM12	-6,48		> -4,90		> -4,90	
SW-620	-5,86		-5,46		-5,07	

CONTINUAÇÃO NA FIG. 4B

FIG. 4A

CONTINUAÇÃO DA FIG. 4A
GRÁFICOS DA MÉDIA

PAINEL/LINHA CELULAR	LOG ₁₀ G150	G150	LOG ₁₀ TGI	TGI	LOG ₁₀ LC50	LC50
CANCRO DO SNC						
SF-268	-7,97	████████	-5,59	████████	-5,24	████████
SF-295	-5,93	████████	-5,49	████████	-5,06	████████
SF-539	-6,05	████████	-5,48	████████	-4,98	████████
SNB-75	-5,75	████████	-5,42	████████	-5,09	████████
U251	-6,58	████████	-6,07	████████	-5,50	████████
MELANOMA						
LOX IMVI	-7,54	████████	-6,88	████████	-6,33	████████
MALME-3M	-5,90	████████	-5,56	████████	-5,21	████████
SK-MEL-2	-6,69	████████	-6,25	████████	-5,73	████████
SK-MEL-28	-6,34	████████	-5,73	████████	-5,32	████████
SK-MEL-5	-5,65	████████	-5,39	████████	-5,13	████████
UACC-257	-5,85	████████	-5,23	████████	> -4,90	████████
UACC-62	-6,18	████████	-5,64	████████	-5,27	████████
CANCRO DOS OVÁRIOS						
IGROV1	-5,57	████████	-5,18	████████	> -4,90	████████
OVCAR-3	-6,11	████████	-5,63	████████	-5,26	████████
OVCAR-5	-5,55	████████	-5,12	████████	> -4,90	████████
OVCAR-8	-5,79	████████	-5,49	████████	-5,20	████████
SK-OV-3	-5,65	████████	-5,28	████████	-4,91	████████

CONTINUAÇÃO NA FIG. 4C
FIG. 4B

CONTINUAÇÃO DA FIG. 4B
GRÁFICOS DA MÉDIA

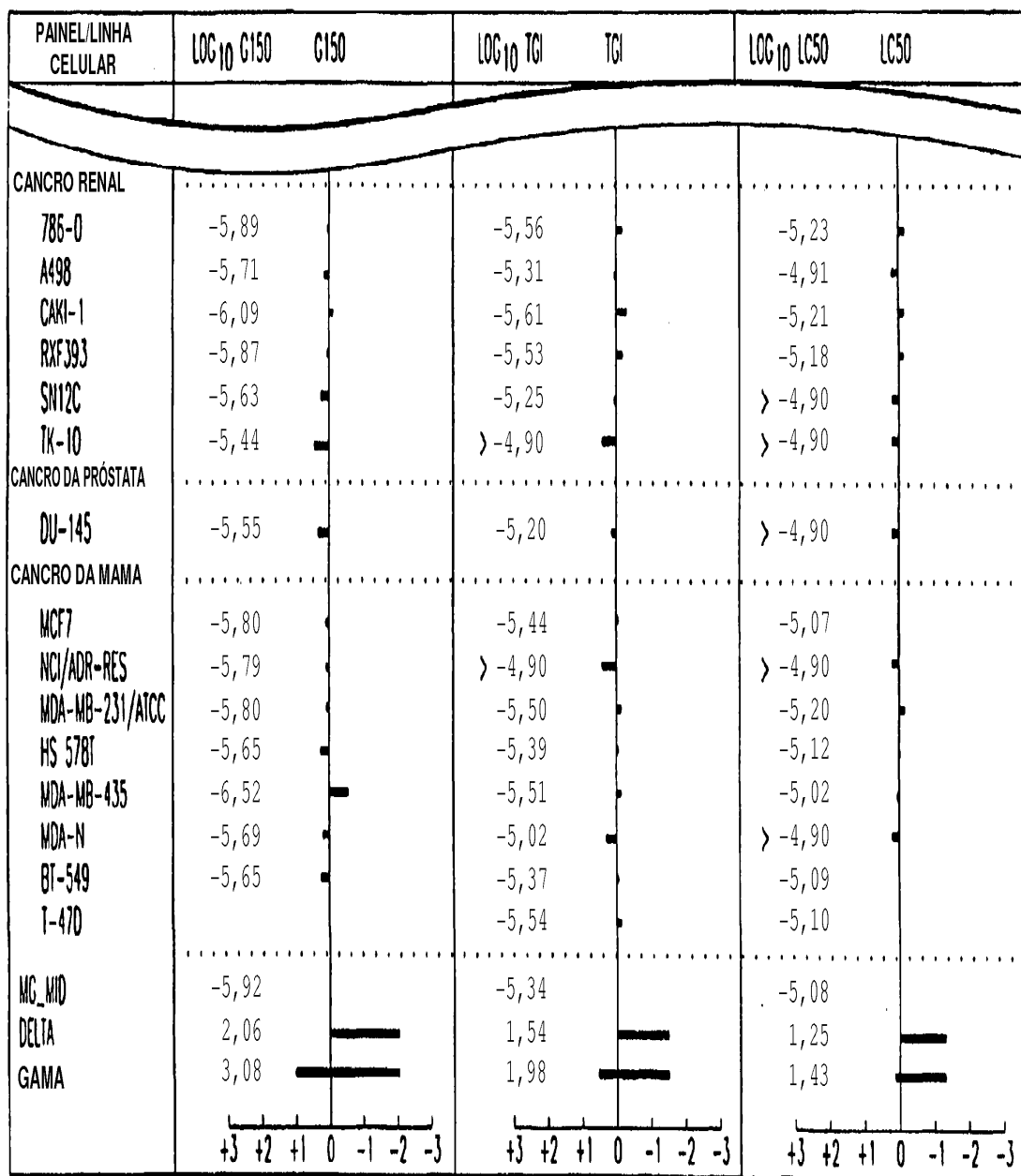


FIG. 4C