

(11) Número de Publicação: PT 644893 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

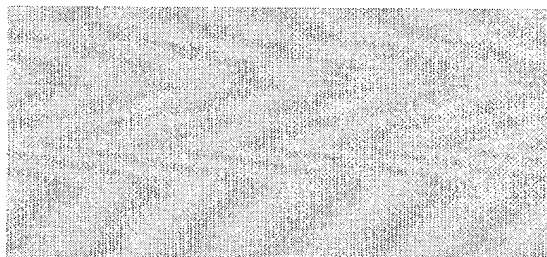
C07K005/12 A C07K007/00 B
C07K007/06 B C07K007/64 B
C07K014/655 B A61K038/08 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1994.02.08	(73) Titular(es): BIOMEASURE, INC. 27 MAPLE STREET MILFORD, MA 01757-3650 US
(30) Prioridade: 1993.02.11 US 16720	
(43) Data de publicação do pedido: 1995.03.29	(72) Inventor(es): JACQUES-PIERRE MOREAU ARTHUR E. BOGDEN US US
(45) Data e BPI da concessão: 2000.04.19	(74) Mandatário(s): JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) Epígrafe: INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR INDUZIDO POR TRAUMA

(57) Resumo:



DESCRIÇÃO**"INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR INDUZIDO POR TRAUMA"**CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a um método terapêutico para inibir o crescimento de um tumor.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A cirurgia citorredutora tem sido utilizada como tratamento adjuvante de doentes com cancro cujo tumor se crê ser demasiado extenso para cura seja por fármacos ou apenas por cirurgia. O crescimento acelerado de metástases após excisão cirúrgica ou desbaste de um tumor primário é um problema clínico reconhecido, e tem sido notado, em particular, no sarcoma osteogénico e cancro testicular.

O fenómeno do crescimento acelerado de metástases tem sido atribuído à libertação de células viáveis resultantes da manipulação do tumor durante a cirurgia, ou à aceleração do crescimento das metástases originadas antes da ocorrência da cirurgia do tumor. O crescimento acelerado de metástases pré-cirúrgicas tem sido atribuído a alterações no estado de imunidade do hospedeiro após a remoção de uma porção maior do tumor ou a outros efeitos directos ou indirectos do procedimento cirúrgico. Tem sido postulado que o tumor microscópico que fique após cirurgia é capaz de crescer mais rapidamente do que o tumor primário porque o primeiro não está sujeito a factores que restringem o seu crescimento, isto é, limites anatómicos, anoxia e deficiências nutricionais.

O crescimento activado de metástases após excisão parcial de tumores implantados em murganhos foi relatado pela primeira vez por Marie e Clunet em 1910, e por Tyzzer em 1913. Estes investigadores afirmaram que a remoção parcial de tumores implantados tornava disponível grandes quantidades de

f L A

"substâncias nutritivas" para activar o crescimento de metástases. Esta teoria foi uma modificação da hipótese de Erlich de que um tumor em crescimento activo retirava do animal hospedeiro certas substâncias específicas para o crescimento.

Mais recentemente, Simpson-Herren et al., [*Cancer Treat. Rep.* 60:1749 (1976)] descreveram um estudo no qual era concebido um procedimento cirúrgico para simular a excisão de tumores mas que deixava o tumor primário e as suas metástases espontâneas não perturbadas (um procedimento de simulação), resultava num ligeiro aumento no índice de timidina de metástases pulmonares de Lewis do tumor de pulmão, e uma diminuição na esperança de vida dos animais.

Outros investigadores relataram crescimentos activados de metástases semelhantes como resultado de trauma cirúrgico, não cirúrgico ou "stress". Como nota particular, Fisher et al., [*Cancer Res.* 49: 1996 (1989)] avaliaram o efeito da remoção de um tumor primário na cinética de células em metástases de seis tumores diferentes. Verificaram um aumento no índice de marcação de focos de tumor distantes (metástases) associado com a remoção de cada tipo de tumor. O soro, obtido de murganhos após remoção de um tumor, quando transferido para murganhos receptores com o mesmo tipo de tumor, resultou num aumento no índice de marcação dos tumores receptores. Contudo, se o soro fosse obtido antes das 18 horas após a cirurgia, ou se o murganho com tumores não fosse sujeito a cirurgia, então o soro não aumentava substancialmente o índice de marcação de tumores em murganhos receptores. Estes investigadores concluíram que os seus resultados refutavam a premissa de que a remoção de um tumor primário é um fenómeno local sem consequências biológicas.

Alexander et al., [*Adv. Exp. Med. Biol.* 233: 345 (1988)] estudaram o fenómeno do crescimento preferencial de células cancerígenas provenientes de sangue em locais de trauma, e concluíram que enquanto vários factores contribuem para tornar

f L A

uma lesão num ambiente mais favorável para o crescimento de metástases, um dos mecanismos principais é a libertação de factores de crescimento por macrófagos que se infiltraram na lesão.

O adenocarcinoma da glândula próstata é uma doença com uma incidência que aumenta rapidamente com a idade após os 50. É o único sítio mais comum de cancro para machos após os 70. Apesar dos avanços na cirurgia e na terapia médica para carcinoma da próstata, esta doença continua a liderar a causa de morte relacionada com o cancro nos homens americanos. Durante os últimos 30 anos, a taxa de mortalidade por cancro da próstata permaneceu essencialmente inalterada.

Existe um número de semelhanças entre a hiperplasia prostática benigna (BPH) e cancro. Embora não tenha sido encontrada nenhuma relação casual entre BPH e cancro da próstata, existe um número de semelhanças impressionantes, incluindo o aumento da incidência e prevalência com a idade, concordante com a história natural, e requisitos hormonais para o crescimento e desenvolvimento.

Embora doentes com doença localizada sejam frequentemente assintomáticos, a doença localizada avançada pode ser acompanhada por sintomas de obstrução dos canais da bexiga, necessitando de intervenção cirúrgica terapêutica. A obstrução de canais benigna por hipertrofia prostática central é também comum, necessitando de ressecção transuretral da próstata (TURP).

A prostatectomia na doença benigna é um misnómero. Apesar do tipo de prostatectomia realizada para doença obstrutiva benigna (suprapúbica, retropúbica, perineal ou transuretral), a próstata não é removida. Uma espessura variável mas substancial do tecido glandular prostático permanece após remoção de um alargamento adenomatoso das glândulas periuretrais. O cancro pode e desenvolve-se nos tecidos prostáticos que permanecem.

O diagnóstico precoce do carcinoma da próstata está dificultado pela ausência de sintomas no homem com tumores localizados. Embora a maior parte dos estudos em pesquisa do cancro da próstata tenham sido conduzidos em homens assintomáticos, outros lidaram com a pesquisa em homens antes da prostatectomia para o presumível envolvimento glandular benigno. Desse modo, é de particular importância que a evidência patológica de cancro clinicamente oculto se verifica em 10% ou 20% dos homens que fazem cirurgia para BPH. Ver Denton, S.E. et al., *J. Urol.* 93: 296 (1965); Sheldon, C.A. et al., *J. Urol.* 124: 626 (1980).

O estágio A do carcinoma da próstata tem sido definido como cancro verificado incidentalmente na autópsia e em secções patológicas de glândulas resseccionadas que se acredita serem pre-operativamente benignas. Whitmore, W.F., Jr., *Amer. J. Med.* 21: 697 (1956). Estudos de autópsia indicam que a incidência de tais casos é de 25% a 30% em homens com mais de 50 anos de idade. Hudson, P.B. et al., *J.A.M.A.* 155: 426 (1954).

Que o trauma cirúrgico pode desencadear estas células cancerígenas latentes a aumentar a proliferação e/ou metástases está indicado pelos exemplos clínicos seguintes. Armenian et al., [Armenian, H.K. et al., *Lancet* 2: 115-117, 1974] conseguiram seguir 611 doentes durante 18 anos após TURP e prostatectomia aberta, e verificaram uma frequência significativamente maior de cancro naqueles com BPH (11,4%) comparado com os controlos sem BPH (3,2%). A taxa de morte para o cancro da próstata era 3,7 vezes superior entre doentes com BPH do que entre os controlos. Os autores também compararam retrospectivamente 290 doentes de cancro com a mesma idade dos controlos, e revelaram um risco relativo de 5,1 para cancro da próstata em doentes tratados para BPH.

Um estudo efectuado por Hanks et al., [*J. Urol.* 129: 309 (1983)] em 443 doentes tratados com terapia de radiação para o

f L A

cancro da próstata, comparou a sobrevivência de doentes cujo cancro tinha sido diagnosticado por TURP com os diagnosticados por biópsia com agulha, um procedimento significativamente menos traumático. Esta análise indicou o dobro da recorrência e de morte de doentes diagnosticados por TURP.

McGowan [*Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 6: 1121 (1980)] relataram um estudo retrospectivo de 291 doentes tratados com radioterapia definitiva no Cross Cancer Institute de Edmonton. O actuário corrigido da sobrevivência independente de doença e sobrevivência para morte intercorrente foram determinados para cada estágio e por meio de diagnóstico. Foi demonstrada uma diferença significativa na sobrevivência de 5 anos de sobrevivência independente de doença para os Estádios B e C: 72% e 51% para agulha versus TURP, respectivamente ($p=0,005$ por teste duplo Gehan's Wilcoxon).

A literatura está repleta de exemplos clínicos ilustrativos da pobreza do prognóstico e a curta sobrevivência de doentes com cancro da próstata sujeitos ao maior trauma cirúrgico de TURP quando comparado com biópsia de agulha.

Um procedimento cirúrgico que está a ganhar popularidade para o tratamento de cancro da mama precoce é a "lumpectomia". Embora a lumpectomia não seja tão traumática como a mastectomia, é um procedimento cirúrgico que não explora, ou remove, os nódulos linfáticos de drenagem que podem conter células cancerosas residuais. A lumpectomia é relativamente nova na cena cirúrgica, e não possui o repertório de estudos clínicos que ilustrem os efeitos de trauma cirúrgico na recorrência de tumores e sobrevivência. Contudo, é provável um paralelismo com a próstata.

Excisão cirúrgica com margem larga é a primeira modalidade terapêutica aplicada ao tratamento de melanoma primário cutâneo maligno. Dependendo do grau de infiltração local ou envolvimento dos nódulos linfáticos de drenagem, a cirurgia pode ser seguida de radiação ou quimioterapia. No entanto, a recorrência de

f L A

pequenas lesões melanolíticas no local cirúrgico ou ao longo dos canais linfáticos de drenagem são prontamente reconhecidos clinicamente e um indicador comum de doença progressiva. Devido à dificuldade no tratamento de melanoma maligno em fase avançada, considerações éticas não permitiram estudos clínicos comparando a sobrevivência ou disseminação metastática de melanoma cutâneo maligno em doentes sujeitos ou não sujeitos a excisão cirúrgica da lesão cutânea primária.

Foi relatado recentemente que um análogo da somatostatina inibe o crescimento mas não a cura de lesão. Ver Abribat T. et al. *Endocrine Society*, 74th Annual Meeting, Abstract #1384 (1992).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método terapêutico para inibição, num mamífero, do crescimento acelerado de um tumor sólido primário ou metastático, resultando de trauma do tecido causado cirurgicamente, não cirurgicamente, ou por ulceração do tecido. O método inclui o passo de administrar ao referido mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de somatostatina ou um agonista da somatostatina.

Também no âmbito desta invenção está um método para produzir um medicamento para inibição, num mamífero, do crescimento acelerado de um tumor sólido primário ou metastático, resultando de trauma do tecido causado cirurgicamente, não cirurgicamente, ou por ulceração do tecido, compreendendo o referido método misturar somatostatina ou um agonista da somatostatina com uma substância transportadora farmacologicamente aceitável.

A definição de "agonista da somatostatina" será definida abaixo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz depende da condição a ser tratada, da via de administração escolhida e da actividade específica do composto utilizado, e em última instância será decidida pelo médico ou veterinário assistente.

f l A

Os tumores que podem ser tratados pelo método terapêutico desta invenção incluem, mas não estão limitados a, tumores epiteliais (tumores de tecidos epiteliais) tais como tumor da próstata, tumor da mama, tumor do cólon, tumor do pulmão, e melanoma. Preferencialmente, o passo de administração é realizado por aplicação tópica ou subcutânea no sítio do trauma.

Outras características e vantagens da invenção serão óbvias a partir da seguinte descrição das realizações preferidas desta, e das realizações.

Abreviaturas

β -Nal = β -naftilalanina

β -Pal = β -piridilalanina

hArg(Bu) = N-guanidino-(butil)-homoarginina

hArg(Et)₂ = N,N'-guanidino-(dimetil)-homoarginina

hArg(CH₂CF₃)₂ = N,N'-guanidino-bis-(2,2,2,-trifluoroetil)-homoarginina

hArg(CH₃, hexil) = N,N'-guanidino-(metil, hexil)-homoarginina

Lys(Me) = N^ε-metil-lisina

Lys(iPr) = N^ε-isopropil-lisina

AmPhe = aminometilfenilalanina

AchxAla = aminociclohexilalanina

Abu = ácido α -aminobutírico

Tpo = 4-tiaprolina

MeLeu = N-metil-leucina

Orn = ornitina

Nle = norleucina

Nva = norvalina

Trp(Br) = 5-bromo-triptofano

Trp(F) = 5-fluoro-triptofano

Trp(NO₂) = 5-nitro-triptofano

Gaba = ácido γ -aminobutírico

Bmp = β -mercaptopropionilo

Ac = acetilo

DESCRIÇÃO DAS REALIZAÇÕES PREFERIDAS

Somatostatina e seus agonistas

A somatostatina (factor de inibição de libertação de somatotropina, ou SRIF) é um inibidor de secreção da hormona de crescimento e foi originalmente isolada a partir do hipotálamo, Brazeau *et al.* *Science* 179:77 (1973). A somatostatina possui um largo espectro de efeitos biológicos, participa num número elevado de processos biológicos e na maior parte dos casos, desempenha o papel de um factor de inibição. Por exemplo, inibe a libertação de prolactina, insulina, glucagon, gastrina, secretina e colecistoquinina. Reichlin S. *Somatostatin*, *N. Eng. J. Med.* 309:1495 e 1556 (1983).

Um dos efeitos mais importantes da somatostatina como factor de inibição de crescimento consiste na sua capacidade para influenciar várias formas de crescimento celular patológico. É bem conhecido da literatura que exerce uma acção inibidora no crescimento de células cancerosas. Ver Schally, A.V. *Cancer Res.* 48:6988 (1988); e Taylor *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:81 (1988).

Do mesmo modo, a somatostaina antagoniza o efeito de alguns factores na proliferação de tumores. Foi recentemente mostrado que análogos da somatostatina eram capazes de activar a enzima fosfatase da tirosina, que antagoniza o efeito de quinases da tirosina, um mediador no efeito mitótico de factores de crescimento (p. ex., factor de crescimento epidérmico, factor de crescimento tipo insulina, etc.). Schally, A.V. *Cancer Res.* 48:6977 (1988); Yarden *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 57:443 (1989).

A somatostatina nativa possui uma duração muito curta do efeito *in vivo*, uma vez que é rapidamente inactivada por endo e exopeptidases. Têm sido preparados muitos análogos novos de modo a aumentar a duração do efeito, a actividade biológica e a

f l A

selectividade desta hormona. Tais análogos serão aqui denominados agonistas da somatostatina.

Os agonistas da somatostatina que podem ser utilizados para a prática do método terapêutico da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, aqueles cobertos por fórmulas ou aqueles especificamente referidos nas publicações apresentadas abaixo.

Pedido de PE No. P5 164 EU (Inventor: G. Keri);

Van Binst, G. *et al.* *Peptide Research* 5:8 (1992);

Horvath, A. *et al.* Abstract, "Conformations of Somatostatin Analogs Having Antitumor Activity" 22° European Peptide Symposium, Setembro 13-19, 1992, Interlaken, Suíça;

Pedido de PE 0 363 589 A2 (1990);

Patente U.S. No. 4 904 642 (1990);

Patente U.S. No. 4 871 717 (1989);

Patente U.S. No. 4 853 371 (1989);

Patente U.S. No. 4 725 577 (1988);

Patente U.S. No. 4 650 787 (1987);

Patente U.S. No. 4 603 120 (1986);

Patente U.S. No. 4 585 755 (1986);

Pedido de PE 0 203 031 A2 (1986);

Patente U.S. No. 4 522 813 (1985);

Patente U.S. No. 4 486 415 (1984);

Patente U.S. No. 4 485 101 (1984);

Patente U.S. No. 4 435 385 (1984);

Patente U.S. No. 4 395 403 (1983);

Patente U.S. No. 4 369 179 (1983);

Patente U.S. No. 4 360 516 (1982);

Patente U.S. No. 4 358 439 (1982);

Patente U.S. No. 4 328 214 (1982);

Patente U.S. No. 4 316 890 (1982);

Patente U.S. No. 4 310 518 (1982);

Patente U.S. No. 4 291 022 (1981);

Patente U.S. No. 4 238 481 (1980);

f L A

Patente U.S. No. 4 235 886 (1980);
Patente U.S. No. 4 211 693 (1980);
Patente U.S. No. 4 190 648 (1980);
Patente U.S. No. 4 146 612 (1979); e
Patente U.S. No. 4 133 782 (1979).

Agonistas da somatostatina preferidos incluem, mas não estão limitados a, os seguintes análogos da somatostatina que são revelados nas referências acima citadas:

H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH;
H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Trp-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-Phe-Lys*-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Asp-Thr-NH₂ (uma
ligação amida formada entre Lys* e Asp);
Ac-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(Bu)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(Et)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-L-hArg(Et)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-L-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(Me)-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(Me)-Thr-Cys-Thr-
NH₂Et
Ac-hArg(CH₃, hexyl)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
H-hArg(hexyl)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂Et;
Ac-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂;

f l A s

Propionil-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys(iPr)-Thr-Cys-
Thr-NH₂;
Ac-D-β-Nal-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Gly-hArg(Et)₂-NH₂;
Ac-D-Lys(iPr)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-
Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-hArg(CH₂CF₃)₂-D-hArg(CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-
Cys-Phe-NH₂;
Ac-D-hArg(Et)₂-D-hArg(Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-
Thr-NH₂;
Ac-Cys-Lys-Asn-4-Cl-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-D-Cys-
NH₂;
Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Phe-NH₂;
Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Cl-Phe-NH₂;
Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-β-Nal-NH₂;
H-D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-β-Nal-NH₂;
H-pentafluoro-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-β-Nal-Cys-pentafluoro-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
H-D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-β-Nal-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-β-Nal-NH₂;
H-D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;
H-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;
Ac-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Phe-Cys-β-Nal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂;
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-N-Me-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe);

f L A

ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-L-Trp-Lys-Thr-Phe) (SEQ ID NO: 1);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp(F)-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-Trp(F)-Lys-Thr-Phe) (SEQ ID NO:2);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-p-Cl-Phe);
ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-D-Lys-Trp-D-Phe);
ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Phe);
ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-Lys-D-Trp-D-Phe);
ciclo (D-Abu-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Tyr);
ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-NH(CH₂)₄CO);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-β-Ala);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Glu)-OH;
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly);
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp(F)-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp(NO₂)-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-Trp(Br)-Lys-Thr-Phe-Gaba)
(SEQ ID NO:3);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe(I)-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Tyr(But)-Gaba);

f L A

ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-Cys)-
OH;

ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-Cys)-
OH;

ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Tpo-Cys)-
OH;

ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-MeLeu-
Cys)-OH;

ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba);

ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Phe-Gaba);

ciclo (Phe-Phe-D-Trp(5F)-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba);

ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys(Ac)-Thr-Phe-NH-(CH₂)₃-CO);

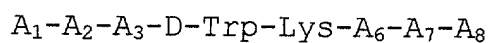
ciclo (Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba);

ciclo (Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); e

ciclo (Orn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba).

Note-se que para todos os agonistas da somatostatina aqui descritos, cada resíduo de aminoácido representa a estrutura de NH-C(R)H-CO-, em que R é a cadeia lateral. No entanto, nas duas fórmulas gerais estabelecidas imediatamente abaixo, A₁ do terminal N e A¹ significam NH₂-C(R)H-CO- e =N-C(R)H-CO-, respectivamente. As linhas entre os resíduos de aminoácido representam as ligações peptídicas que ligam os aminoácidos. Também, quando o resíduo de aminoácido é opticamente activo, é a configuração de forma L que se pretende, a menos que a forma D esteja expressamente designada. É formada uma ponte dissulfureto entre dois resíduos Cys; no entanto, não é apresentada.

Agonistas da somatostatina também preferidos da invenção têm a fórmula seguinte:

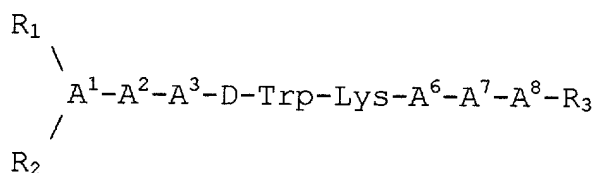


em que A₁ é um isómero D ou L de β-Nal, Trp, β-Pal, Phe, Phe substituído, ou removido; A₂ e A₇, independentemente são

f l A

Cys, Asp, ou Lys, e estão covalentemente ligados através de uma ponte dissulfureto ou uma ponte de amida; A₃ é Phe ou X-Phe o-, m- ou p- substituído, em que X é um halogênio, OH, NH₂, NO₂ ou alquilo C₁₋₃; A₆ é Val, Thr, Ser, Ala, Phe, β-Nal, Abu, Ile, Nle, ou Nva; e A₈ é Phe, Tyr, Trp, Ser, β-Nal, ou removido; desde que quando um de entre A₂ e A₇ for Cys, o outro também é Cys e quando nem A₂ nem A₇ forem Cys, A₂ é diferente de A₇.

A utilização de agonistas lineares de somatostatina da fórmula seguinte, está também incluída na invenção:



em que

A¹ é um isómero D- ou L- de Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Thr, Ser, β-Nal, β-Pal, Trp, Phe, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, p-X-Phe, ou o-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A² é Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Phe, β-Nal, piridil-Ala, Trp, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, o-X-Phe, ou p-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A³ é piridil-Ala, Trp, Phe, β-Nal, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, o-X-Phe, ou p-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A⁶ é Val, Ala, Leu, Ile, Nle, Thr, Abu, ou Ser;

A⁷ é Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Phe, β-Nal, piridil-Ala, Trp, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, o-X-Phe, ou p-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A⁸ é um isómero D- ou L- de Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Thr, Ser, Phe, β-Nal, piridil-Ala, Trp, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, p-X-Phe, ou o-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br,

f L A

F, OH, OCH₃ ou NO₂;

cada R₁ e R₂, independentemente, é H, acilo baixo ou alquilo baixo; e R₃ é OH ou NH₂; desde que pelo menos um de A¹ e A⁸ e um de A² e A⁷ sejam um aminoácido aromático; e ainda desde que A¹, A², A⁷ e A⁸ não possam ser todos aminoácidos aromáticos.

Agonistas lineares particularmente preferidos para serem utilizados no método desta invenção incluem:

H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂.

H-D-Phe-p-NO₂-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂;

H-D-Nal-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂.

H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂.

H-D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂.

H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂.

H-D-Phe-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Ala-β-D-Nal-NH₂.

Se desejável, a parte hidrofóbica (p.ex., um grupo acilo) pode ser ligada ao azoto do grupo amino no terminal N de um agonista de somatostatina.

Proliferação de tumor após trauma

Antes de revelar os métodos preferidos de utilização de somatostatina ou seus agonistas para inibir, num mamífero, o crescimento acelerado de um tumor sólido primário ou metastático resultante de trauma de tecido causado cirurgicamente, não cirurgicamente ou por ulceração do tecido, é primeiro fornecida evidência experimental do crescimento do tumor induzido por trauma.

A vaga proliferativa de tumor residual em animais tratados cirurgicamente indicaria a libertação de factores de crescimento da área do trauma. Para determinar a duração da libertação de tais factores pós-trauma, foi induzido trauma cirúrgico em cinco grupos (10 animais por grupo), e cinco grupos (10 animais por grupo) foram retidos como controlos não tratados cirurgicamente. O tratamento dos vários grupos está

sumarizado na Tabela 1.

TABELA 1

Proliferação Induzida por Trauma de Melanoma Subcutâneo

Grupo No.	Tratamento	Dias Implantação	Pós	Peso do Tumor	Taxa de Crescimento
1	Cirurgia do flanco esquerdo, dia 0. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0.	14		1031±112	73,6
2	Cirurgia do flanco esquerdo, dia 0. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 1.	15		1391±166	92,7
3	Cirurgia do flanco esquerdo, dia 0. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 2.	14		1333±244	95,2
4	Cirurgia do flanco esquerdo, dia 0. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 3.	15		764±166	50,9
5	Cirurgia do flanco esquerdo, dia 0. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 4	14		558±200	39,8
6	Controlo sem cirurgia. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0.	14		454±76	32,5
7	Controlo sem cirurgia. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 1.	15		972±232	64,8
8	Controlo sem cirurgia. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 2.	14		813±268	58,1
9	Controlo sem cirurgia. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 3.	15		950±185	63,3
10	Controlo sem cirurgia. Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 4.	14		448±111	31,9

Procedimento cirúrgico: Excisão estéril de um enxerto de pele de espessura total do flanco esquerdo. Margens da lesão imediatamente aproximadas e fechadas com grampos Michel. Os animais tratados cirurgicamente foram cuidadosamente seleccionados aleatoriamente.

Melanoma B16: Implante 10^5 células B16-F10, s.c., flanco direito em p.m.

As unidades do peso do tumor e da taxa de crescimento são mg e mg/dia, respectivamente.

Os tamanhos dos tumores foram determinados três vezes por semana com compassos Vernier, e a taxa de crescimento por dia foi calculada no final do período teste. Na Tabela 1, são feitas comparações entre o Grupo 1 e o Grupo 6; Grupo 2 e Grupo 7; Grupo 3 e Grupo 8; Grupo 4 e Grupo 9; e Grupo 5 e Grupo 10. O aumento em percentagem na taxa de crescimento por dia nos grupos tratados cirurgicamente em relação à dos correspondentes controlos não traumatizados indica que o estímulo do

f L A

crescimento do tumor começa a ocorrer no dia da traumatização. O efeito resultante no crescimento do tumor é facilmente mensurável daí em diante, e diminui para os níveis de crescimento normal pelo dia 4.

Estes resultados correlacionam-se bastante bem com as observações de Aamdal, et al. [*Br. J. Cancer* 51:347 (1985)], que mediram a actividade mitótica de cápsulas subrenais implantadas com xenoenxertos de tumor humano, em murganhos. Neste estudos, melanomas humanos, carcinomas do cólon e sarcomas exibiram um surto proliferativo após o trauma cirúrgico de implantação da cápsula subrenal.

Inibição de crescimento de tumor da próstata induzido por trauma

O seguinte estudo foi planeado para demonstrar o efeito terapêutico da aplicação de BIM-23014 (um agonista da somatostatina com a estrutura de H-D- β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂), topicamente, ou no sítio do tumor ou no sítio traumatizado cirurgicamente, para inibir o surto proliferativo de tumor da próstata após trauma cirúrgico. Os resultados, bem como uma breve descrição da experiência, são apresentados na Tabela 2 abaixo. Os resultados são relatados como médias $\pm$ s.e.m. em 10 animais/grupo.

f L A

TABELA 2

Tratamento de Proliferação Induzida por Trauma Cirúrgico
(Tumor da Próstata)

Grupo No.	Tratamento	Alteração no Peso do Tumor Dia 6-17 (mg)	Percentagem Teste/Controlo
1	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Sem cirurgia. Controlo de armazenamento	1921±260	123
2	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. Controlo de armazenamento	2366±434	
3	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. Veículo 10%DMSO/salino, tópico para o tumor, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	2100±321	98
4	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. BIM-23014, tópico para o tumor, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	2052±196	
5	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. Veículo 10%DMSO/salino, tópico para a área de cirurgia, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	2410±289	77
6	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. BIM-23014, tópico para a área de cirurgia, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	1854±328	

Mais especificamente, a implantação de tumor foi realizada em todos os animais teste, i.e., Grupos 1-6, por implantação subcutânea de um triturado de 2 mm³ de 2PR121D(1), uma linha celular de tumor da próstata, no flanco direito no dia 0. O trauma cirúrgico foi induzido no flanco esquerdo de cinco grupos de murganhos Noble machos, i.e., Grupos 2-6. O procedimento cirúrgico foi realizado primeiro excisando um enxerto de pele de espessura total do flanco esquerdo, sob precauções de esterilidade. Foi utilizado um tubo de ensaio de 15 mm de D, como marcador, para delinear a pele a ser excisada para padronizar a área cirúrgica. As margens da lesão foram

f l A

imediatamente aproximadas e fechadas com grampos Michel. A cirurgia foi realizada no dia 3 após implantação de células de tumor da próstata.

Tanto o placebo (de dimetilsulfóxido ["DMSO"] a 10% em salino) como BIM-23014 (10 mg/ml em veículo de DMSO a 10%/salino) foram aplicados topicamente com espalhamento suave durante exactamente um minuto, sendo o volume aplicado de 0,1 ml.

Como apresentado na Tabela 2, as células de tumor da próstata implantadas s.c. em animais não traumatizados cirurgicamente no dia 0 produziram tumores com um peso médio de 1921 mgs entre os dias 6-17 (Grupo 1). O inóculo do mesmo tamanho de células de tumor da próstata, implantados no lado oposto à área traumatizada, produziu tumores pesando 2366 mgs no mesmo período de tempo (Grupo 2). Assim, o trauma cirúrgico induziu proliferação acelerada de tumor da próstata como indicado pelo valor do Teste/Controlo de 123%. BIM-23014 aplicado directamente no sítio do tumor resultou em tumores pesando 2052 mgs (Grupo 4); enquanto que placebo de DMSO a 10%/salino aplicado directamente ao sítio do tumor resultou em tumores pesando 2100 mgs (Grupo 3), produzindo um valor Teste/Controlo de apenas 98%.

Quando o veículo de DMSO a 10%/salino foi aplicado à área traumatizada cirurgicamente no flanco esquerdo (Grupo 5), não houve efeito aparente, com os tumores no flanco direito crescendo para uma média de 2410 mgs (cf. 2366 mgs para o Grupo 2). É importante que quando BIM-23014 foi aplicado topicamente à área traumatizada cirurgicamente (flanco esquerdo) em vez de à área não traumatizada (flanco direito) (Grupo 6), o crescimento do tumor foi marcadamente inibido resultando em tumores pesando 1854 mgs, um valor Teste/Controlo de 77%.

Noutro estudo, um triturado fino de tecido de tumor da próstata de rato 11095, 1-2 mm³, foi implantado s.c., flanco

f. L. A.

direito, em ratos da estirpe Fischer 344 no dia 0. No dia 2, 48 horas mais tarde, todos os animais foram traumatizados cirurgicamente por excisão de um enxerto de espessura dérmica total de 1 cm² do flanco oposto (esquerdo). A aplicação tópica do veículo de DMSO a 40%/salino, ou BIM-23014, ao sítio da cirurgia foi iniciada na tarde do dia 2 e continuada b-i-d até ao dia 9. Os tamanhos do tumor foram determinados com compassos de Vernier e o peso foi calculado a partir da fórmula para um elipsóide comprimento x largura²/2 (mg). Como apresentado na TABELA 3, a aplicação de BIM-23014 resultou num valor teste/controlo de 48% (Grupo 3/Grupo 1).

TABELA 3

Supressão do Surto Proliferativo Após Trauma Cirúrgico
(Tumor da Próstata 11095)

Grupo No.	Tratamento	Peso do Tumor* (mg) Dia 9	Percentagem Teste/Controlo
1	Cirurgia Dia 2, controlo de armazenamento não tratado	1973±312	--
2	Cirurgia Dia 2, DMSO a 40%/salino para a área cirúrgica, b.i.d., q.d. 2-9	1132±62	57
3	Cirurgia Dia 2, BIM-23014 em DMSO a 40%/salino para área cirúrgica, b.i.d., q.d. 2-9	957±13	48

*Resultados apresentados como médias ± s.e.m. em 6 a 10 animais/grupo. Significância da diferença: Grupo 1 e Grupo 2 = p<0,001; Grupo 1 e Grupo 3 = p<0,001.

Inibição de crescimento de tumor da mama induzido por trauma

A resposta de xenoenxertos de tumor da mama humano a trauma cirúrgico resultante de um procedimento de remoção de tumor (citorredução) é demonstrado por uma experiência na qual murganhos fêmeas atímicos sem pêlo foram utilizados como recipientes de xenoenxertos de células de tumor da mama humano indiferenciadas, MX-1. Um grupo de murganhos foi implantado bilateralmente com células MX-1; enquanto que outro grupo de animais foram implantados apenas no flanco direito no dia 0.

f L A

No dia 13, os tumores do flanco esquerdo no primeiro grupo de murganhos foram excisados cirurgicamente. Os resultados demonstram que os tumores nos animais sujeitos a um procedimento citorredutor (lumpectomia) experimentaram um aumento na taxa de crescimento em relação à de animais não traumatizados cirurgicamente, i.e., sendo a alteração no tamanho do tumor (peso) durante o período de 10 dias após cirurgia de 747 mgs vs 618 mgs.

O seguinte estudo foi planeado para demonstrar o efeito terapêutico de aplicar BIM-23014 topicamente, seja no sítio do tumor ou no sítio traumatizado cirurgicamente, para inibir o surto proliferativo de tumor da mama após trauma cirúrgico. Os resultados, bem como uma breve descrição da experiência, são apresentados na Tabela 4 abaixo. Os resultados são fornecidos como médias $\pm$ s.e.m. em 8 animais/grupo.

f L A

TABELA 4

Tratamento de Proliferação Induzida por Trauma Cirúrgico
(Tumor da Mama Humano)

Grupo No.	Tratamento	Peso do Tumor* (mg) Dia 14	Percentagem Teste/Controle
1	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Sem cirurgia. Controle de armazenamento.	245±40	135
2	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. Controle de armazenamento.	332±46	
3	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. Veículo 10%DMSO/salino, tópico para o tumor, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	339±63	147
4	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. BIM-23014, tópico para o tumor, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	500±116	
5	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. Veículo 10%DMSO/salino, tópico para a área de cirurgia, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	408±159	72
6	Tumor implantado s.c., flanco direito, dia 0. Cirurgia flanco esquerdo, dia 3. BIM-23014, tópico para a área de cirurgia, b.i.d., q.d. 3(p.m.).	296±52	

Mais especificamente, a implantação de tumor foi realizada em todos os animais teste, i.e., Grupos 1-6, por implantação subcutânea de um triturado de 2 mm³ de células MX-1 no flanco direito no dia 0. O trauma cirúrgico foi induzido no flanco esquerdo de cinco grupos de fêmeas de murganho atímicas sem pêlo, i.e., Grupos 2-6. Um tubo de ensaio de 15 mm de D foi utilizado para delinear a pele a ser excisada para padronização da área cirúrgica. O procedimento cirúrgico foi realizado por primeiro excisar um enxerto de pele de espessura total, do flanco esquerdo, sob precauções de esterilidade. As margens da lesão foram imediatamente aproximadas e fechadas

f. l. A

com grampos Michel. A cirurgia foi realizada no dia 3 após a implantação das células MX-1.

Tanto placebo (DMSO a 10% em salino) como BIM-23014 (10 mg/ml em veículo de DMSO a 10%/salino) foram aplicados topicamente com espalhamento suave durante exactamente um minuto, sendo o volume aplicado de 0,05 ml (1 gota).

Como apresentado na Tabela 4, células de tumor da mama implantadas s.c. em animais não traumatizados cirurgicamente no dia 0, produziram tumores com o peso médio de 245 mgs no dia 14 (Grupo 1). O inóculo do mesmo tamanho de células de tumor da mama, implantado no lado oposto à área traumatizada, produziu tumores pesando 332 mgs no mesmo período de tempo (Grupo 2). Assim, o trauma cirúrgico induziu proliferação acelerada de tumor da mama como indicado pelo valor de 135% do Teste/Controlo. BIM-23014 aplicado directamente no sítio do tumor resultou em tumores pesando 500 mgs (Grupo 4); enquanto que placebo de DMSO a 10%/salino aplicado directamente ao sítio do tumor resultou em tumores pesando 339 mgs (Grupo 3), produzindo um valor de Teste/Controlo de 147%.

Quando o veículo de DMSO a 10%/salino foi aplicado à área traumatizada cirurgicamente no flanco esquerdo de animais possuindo um tumor no flanco direito não traumatizado (Grupo 5), não existiu efeito inibidor, com os tumores crescendo até uma média de 408 mgs (cf. 332 mgs para o Grupo 2). É importante que, quando BIM-23014 foi aplicado topicamente à área cirurgicamente traumatizada (flanco esquerdo) em vez de à área não traumatizada (flanco direito) (Grupo 6), o crescimento do tumor foi marcadamente inibido resultando em tumores pesando 296 mgs, um valor de Teste/Controlo de 72%.

Inibição do crescimento de melanoma maligno induzido por trauma

Numa experiência, foi estudado o efeito do trauma cirúrgico local no crescimento e capacidade de resposta de

f. L. A.

melanoma cutâneo maligno (B16-F10) a BIM-23014. Sob precauções de esterilidade, um pedaço de pele de espessura total, aproximadamente 1 cm de diâmetro, foi excisado do flanco direito de murganhos convencionais singeneicos C57BL/6 e a lesão imediatamente fechada com grampos Michel no dia 0. No dia 1, todos os animais foram implantados s.c. na área cirúrgica com células B16-F10. O tratamento com BIM-23014 tanto no sítio oposto do tumor como na lesão, foi iniciado no dia 2.

Os resultados desta experiência estão sumarizados na Tabela 5 com os resultados apresentados como médias $\pm$ sem em grupos de 10 animais. O peso médio do tumor nos animais não traumatizados cirurgicamente (Grupo 1) no dia 15 foi de 765 mgs, enquanto que o peso médio do tumor em animais cirurgicamente traumatizados (Grupo 2) foi de 2280 mgs. Os tumores implantados na área cirurgicamente traumatizada eram quase três vezes maiores (valor de Teste/Controlo de 298%, $p < 0,001$) do que os tumores em animais não traumatizados. A administração de BIM-23014 a animais traumatizados não cirurgicamente (Grupo 4) subcutaneamente, distante do tumor, apresentou um pequeno efeito inibidor do tumor induzindo apenas a um valor de Teste/Controlo de 90% (Grupo 4/Grupo 3). A mesma concentração de BIM-23014 administrada na lesão (sítio cirúrgico) apresentou um efeito inibidor do tumor maior, induzindo a um valor de Teste/Controlo de 78% (Grupo 6/Grupo 5). A resposta da administração na lesão de BIM-23014 sugeriu a praticabilidade da aplicação de BIM-23014 no tumor ou sítio cirúrgico.

f L A

TABELA 5

Tratamento de Proliferação Induzida por Trauma Cirúrgico
(Melanoma Maligno)

Grupo No.	Tratamento	Peso do Tumor* Dia 15 (mg)	Percentagem Teste/ Controlo
1	Sem trauma cirúrgico. Controlo tratado com veículo salino, 0,2 ml/inj., s.c., b.i.d., q.d. 2-14.	765±191	298
2	Trauma cirúrgico dia 0. Controlo tratado com veículo salino, 0,2 ml/inj., s.c., b.i.d., q.d. 2-14.	2280±330	
3	Sem trauma cirúrgico. Controlo tratado com veículo de DMSO a 25%/salino, 0,4 ml/inj., s.c., b.i.d., q.d. 2-14.	1034±195	90
4	Sem trauma cirúrgico. BIM-23014, 500 µg/inj., em DMSO a 25%/salino s.c., b.i.d., q.d. 2-14	928±167	
5	Trauma cirúrgico. Controlo tratado com veículo salino, 0,2 ml/inj., s.c., na lesão, b.i.d., q.d., 2-14.	2039±373	78
6	Sem trauma cirúrgico. BIM-23014, 500 µg/inj., na lesão, s.c., b.i.d., q.d. 2-14	1581±311	

* Resultados apresentados como médias ± s.e.m. em 10 animais/grupo. Significância da diferença: Grupo 1 e Grupo 2 = $p < 0,001$; Grupo 2 e Grupo 4 = $p < 0,05$.

O estudo seguinte foi planeado para demonstrar o efeito terapêutico de aplicar BIM-23014 topicamente, quer ao sítio do tumor quer ao sítio traumatizado cirurgicamente, para inibir o surto proliferativo de melanoma maligno após trauma cirúrgico. Os resultados, bem como uma breve descrição da experiência, são apresentados na Tabela 6 abaixo. Os resultados são apresentados como médias ± s.e.m. em 8 animais/grupo. Foram utilizados murganhos C57BL/6 singeneicos convencionais.

f. L. A.

TABELA 6

Tratamento de Proliferação Induzida por Trauma Cirúrgico
(Melanoma Maligno)

Grupo No.	Tratamento	Peso do Tumor* Dia 12 (mg)	Percentagem Teste/ Controlo
1	Melanoma Implantado, flanco direito, dia 0. Sem cirurgia, controlo de armazenamento não tratado.	339±60	212
2	Melanoma Implantado, tratado cirurgicamente, flanco direito, dia 0. Controlo de armazenamento não tratado.	719±134	
3	Melanoma Implantado, tratado cirurgicamente, flanco direito, dia 0. Controlo tratado com placebo, 0,05 ml de veículo de DMSO a 50%/salino, tópico, b.i.d., q.d. 1-11.	593±214	89
4	Melanoma Implantado, tratado cirurgicamente, flanco direito, dia 0. Tratado com BIM-23014, 0,05 ml de DMSO a 50%/salino contendo 10 mg/ml de BIM-23014, tópico, b.i.d., q.d. 1-11	527±117	
5	Flanco direito tratado cirurgicamente, melanoma implantado no flanco direito, dia 0. Área cirúrgica tratada com placebo controlo, 0,05 ml de veículo de DMSO a 50%/salino, tópico, b.i.d., q.d., 1-11.	856±248	57
6	Flanco direito tratado cirurgicamente, melanoma implantado no flanco direito, dia 0. Área cirúrgica tratada com BIM-23014, 0,05 ml de veículo de DMSO a 50%/salino, contendo 10 mg/ml de BIM-23014, tópico, b.i.d., q.d. 1-11	488±187	

* Resultados apresentados como médias ± s.e.m. em 8 animais/grupo.
Significância da diferença: Grupo 1 e Grupo 2 = $p < 0,05$.

Mais especificamente, sob precauções de esterilidade, um pedaço de pele (espessura total) de aproximadamente 1 cm de diâmetro foi excisado do flanco direito dos Grupos 2, 3 e 4, e do flanco esquerdo dos Grupos 5 e 6. A lesão foi imediatamente fechada com grampos Michel. O procedimento cirúrgico foi

f. L. A.

realizado cedo na parte da manhã do dia 0. Na parte da tarde do mesmo dia, 10^5 células de melanoma B16-F10 foram implantadas, por via de seringa e agulha, directamente na área tratada cirurgicamente (lesão) dos Grupos 2, 3, e 4 e no lado oposto, flanco direito não tratado cirurgicamente dos Grupos 1, 5 e 6.

O tratamento tópico com BIM-23014 (10 mg/ml em veículo de DMSO a 50%/salino) e placebo (DMSO a 50%/salino) foi iniciado no dia 1. A aplicação tópica foi aplicada gentilmente sobre e à volta da área cirúrgica. Para os animais dos Grupos 5 e 6 foram apenas tratadas áreas cirúrgicas no flanco direito.

Como apresentado na Tabela 6, células de melanoma malignas implantadas s.c. em animais não traumatizados cirurgicamente no dia 0, produziram tumores com um peso médio de 339 mgs no dia 12 (Grupo 1). O inóculo do mesmo tamanho de células de melanoma, implantado directamente na área traumatizada, produziu tumores pesando 719 mgs no mesmo período de tempo (Grupo 2), um aumento proliferativo induzido por trauma de duas vezes (valor de Teste/controlo de 212%, $p < 0,05$). BIM-23014 aplicado directamente ao sítio do tumor resultou em tumores pesando 527 mgs (Grupo 4); enquanto que o placebo de DMSO a 50%/salino aplicado directamente ao sítio do tumor resultou em tumores pesando 593 mgs (Grupo 3), produzindo um valor de Teste/Controlo de apenas 89%.

Quando o veículo de DMSO a 50%/salino foi aplicado na área traumatizada cirurgicamente no flanco esquerdo de animais contendo um tumor no flanco direito não traumatizado (Grupo 5), não existia efeito inibidor com os tumores crescendo até uma média de 856 mgs (cf. 719 mgs para o Grupo 2). É importante que quando BIM-23014 foi aplicado topicamente à área traumatizada cirurgicamente (flanco esquerdo) em vez de à área não traumatizada (flanco direito) (Grupo 6), o crescimento do tumor foi marcadamente inibido resultando em tumores pesando 488 mgs, um valor de Teste/Controlo de 57%.

OUTRAS REALIZAÇÕES

A descrição apresentada foi limitada a realizações específicas desta invenção. Deve contudo ser evidente, que podem ser feitas variações e modificações à invenção, com a obtenção de algumas ou todas as vantagens da invenção. Tais realizações estão também no âmbito das reivindicações seguintes.

Lisboa, 28 de Abril de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h c A

f l A

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de somatostatina ou de um agonista de somatostatina para o fabrico de um medicamento para utilização num método de inibição, num mamífero, do crescimento acelerado de um tumor sólido primário ou metastático, resultante de trauma de tecido causado cirurgicamente, não cirurgicamente, ou por ulceração do tecido, compreendendo o referido método administrar o referido medicamento ao referido mamífero no local do referido trauma.
2. Utilização, de acordo com a reivindicação 1, para o fabrico de um referido medicamento para administração tópica.
3. Utilização, de acordo com a reivindicação 1, para o fabrico de um referido medicamento para administração subcutânea.
4. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 de um agonista da somatostatina.
5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o referido agonista da somatostatina é seleccionado do grupo compreendendo:

H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH;

H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Trp-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

Ac-D-Phe-Lys*-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Asp-Thr-NH₂

(uma ligação amida formada entre Lys* e Asp);

f L A

Ac-hArg (Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (Bu)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (Et)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-L-hArg (Et)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-
 NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-
 NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-
 NH₂;
 Ac-L-hArg (CH₂-CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-
 NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys (Me)-Thr-Cys-
 Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys (Me)-Thr-Cys-
 Thr-NH₂;
 Ac-hArg (CH₃, hexyl)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-
 NH₂;
 H-hArg (hexyl)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂;
 Propionil-D-hArg (Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys (iPr)-Thr-
 Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-β-Nal-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Gly-hArg (Et)₂-
 NH₂;
 Ac-D-Lys (iPr)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-
 Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;
 Ac-D-hArg (CH₂CF₃)₂-D-hArg (CH₂CF₃)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-
 Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂;
 Ac-D-hArg (Et)₂-D-hArg (Et)₂-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-
 Cys-Thr-NH₂;

f L A

Ac-Cys-Lys-Asn-4-Cl-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-
D-Cys-NH₂;

Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Phe-NH₂;

Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Cl-Phe-NH₂;

Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- β -Nal-NH₂;

H-D- β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys- β -Nal-NH₂;

H-pentafluoro-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-
NH₂;

Ac-D- β -Nal-Cys-pentafluoro-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-
NH₂;

H-D- β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- β -Nal-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys- β -Nal-NH₂;

H-D- β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;

H-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;

Ac-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Phe-Cys- β -Nal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂;

ciclo (Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe);

ciclo (Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe);

ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-N-Me-Phe);

ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe);

ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe);

ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe);

ciclo (Pro-Phe-L-Trp-Lys-Thr-Phe) (SEQ ID NO: 1);

ciclo (Pro-Phe-D-Trp(F)-Lys-Thr-Phe);

ciclo (Pro-Phe-Trp(F)-Lys-Thr-Phe) (SEQ ID NO:2);

ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe);

ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-p-Cl-Phe);

ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-D-Lys-Trp-D-Phe);

ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Phe);

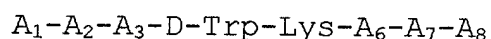
f u A

ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-Lys-D-Trp-D-Phe);
ciclo (D-Abu-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Tyr);
ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe);
ciclo (Pro-Phe-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe);
ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-NH(CH₂)₄CO);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-β-Ala);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Glu)-OH;
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe);
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly);
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp(F)-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp(NO₂)-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-Trp(Br)-Lys-Thr-Phe-Gaba)
(SEQ ID NO:3);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe(I)-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Tyr(But)-Gaba);
ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-
Cys)-OH;
ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-
Cys)-OH;
ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Tpo-
Cys)-OH;
ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-
MeLeu-Cys)-OH;
ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba);

f L A

ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Phe-Gaba);
ciclo (Phe-Phe-D-Trp(5F)-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba);
ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys(Ac)-Thr-Phe-NH-(CH₂)₃-CO);
ciclo (Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba);
ciclo (Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); e
ciclo (Orn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba).

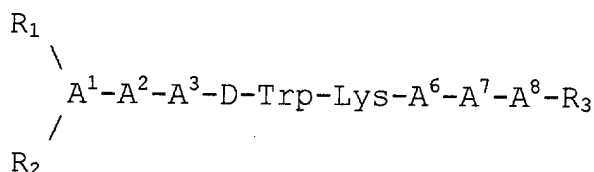
6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido agonista da somatostatina é H-D- β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o referido agonista da somatostatina é da fórmula geral



em que A₁ é um isómero D ou L de β -Nal, Trp, β -Pal, Phe, Phe substituído, ou removido; A₂ e A₇, independentemente são Cys, Asp, ou Lys, e estão covalentemente ligados através de uma ponte dissulfureto ou uma ponte de amida; A₃ é Phe ou X-Phe o-, m- ou p-substituído, em que X é um halogénio, OH, NH₂, NO₂ ou alquilo C₁₋₃; A₆ é Val, Thr, Ser, Ala, Phe, β -Nal, Abu, Ile, Nle, ou Nva; e A₈ é Phe, Tyr, Trp, Ser, β -Nal, ou removido; desde que quando um de entre A₂ e A₇ é Cys, o outro é também Cys e quando nem A₂ nem A₇ forem Cys, A₂ é diferente de A₇.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o referido agonista da somatostatina é um agonista da somatostatina linear de fórmula geral

f L A



em que

A^1 é um isómero D- ou L- de Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Thr, Ser, β -Nal, β -Pal, Trp, Phe, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, p-X-Phe, ou o-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A^2 é Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Phe, β -Nal, piridil-Ala, Trp, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, o-X-Phe, ou p-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A^3 é piridil-Ala, Trp, Phe, β -Nal, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, o-X-Phe, ou p-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A^6 é Val, Ala, Leu, Ile, Nle, Thr, Abu, ou Ser;

A^7 é Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Phe, β -Nal, piridil-Ala, Trp, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, o-X-Phe, ou p-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

A^8 é um isómero D- ou L- de Ala, Leu, Ile, Val, Nle, Thr, Ser, Phe, β -Nal, piridil-Ala, Trp, 2,4-dicloro-Phe, pentafluoro-Phe, p-X-Phe, ou o-X-Phe, em que X é CH₃, Cl, Br, F, OH, OCH₃ ou NO₂;

cada R_1 e R_2 , independentemente, é H, acilo baixo ou alquilo baixo; e R_3 é OH ou NH₂; desde que pelo menos um de A^1 e A^8 e um de A^2 e A^7 sejam um aminoácido aromático; e ainda desde que A^1 , A^2 , A^7 e A^8 não possam ser todos aminoácidos aromáticos.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o referido agonista da somatostatina linear é seleccionado de um grupo compreendendo

H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂.
H-D-Phe-p-NO₂-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂;
H-D-Nal-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂.
H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂.
H-D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂.
H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂.
H-D-Phe-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Ala-β-D-Nal-NH₂.

10. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9, para o fabrico de um medicamento para utilização na inibição de crescimento acelerado de tumor causado cirurgicamente.
11. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, para o fabrico de um medicamento para utilização na inibição de crescimento acelerado de tumor epitelial.
12. Utilização de acordo com a reivindicação 11, para o fabrico de um medicamento para utilização na inibição de crescimento acelerado de melanoma ou tumor da próstata, mama, pulmão ou do cólon.

Lisboa, 28 de Abril de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h u A