



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

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

(11) Número de Publicação: **PT 1263440 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/55 (2006.01) **A61K 31/475** (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01) **A61K 31/70** (2006.01)

A61K 31/7042 (2006.01) **A61K 31/7048**

(2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01) **A61K 33/24**

(2006.01)

A61K 45/00 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2001.03.15**

(30) Prioridade(s): **2000.03.15 US 189699**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.12.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.06.21**
011/2006

(73) Titular(es):

CHEMGENEX PHARMACEUTICALS, INC.

3475 EDISON WAY, SUITE M MENLO PARK CA
94025

US

(72) Inventor(es):

DENNIS, M. BROWN

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES DE COMBINAÇÃO DO ALCALÓIDE CEFALOTAXINA E SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Composições de combinação do alcalóide cefalotaxina e sua utilização"

Descreve-se um método de tratamento de um hospedeiro com uma doença celular proliferativa, que compreende o contacto do hospedeiro com uma cefalotaxina e um agente antiproliferativo, cada um em quantidade suficiente para modular a referida doença celular proliferativa. Em algumas concretizações, a cefalotaxina compreende homo-harringtonina (cefalotaxina, éster 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metil-pentil)butanodioato). Os agentes antiproliferativos de acordo com o invento compreendem agentes alquilantes, agentes intercalantes, complexos de coordenação de metais, nucleósidos de pirimidina, nucleósidos de purina, inibidores de enzimas e proteínas associadas a ácidos nucleicos, e agentes que afectam proteínas estruturais e enzimas citoplasmáticas.

DESCRIÇÃO

"Composições de combinação do alcalóide cefalotaxina e sua utilização"

Campo do invento

O campo técnico do invento é a utilização do alcalóide cefalotaxina com agentes antiproliferativos para tratar um hospedeiro com uma doença celular proliferativa.

Antecedentes do invento

Existe um interesse considerável em modular a eficácia dos agentes antiproliferativos correntemente usados de forma a aumentar a rapidez e duração dos efeitos antitumorais associados aos agentes antineoplásicos convencionais.

Os agentes antiproliferativos tradicionais usados no tratamento do cancro estão agrupados de uma maneira geral nos compostos químicos que (1) afectam a integridade dos polímeros de ácido nucleico através de ligação, alquilação, indução de quebras na cadeia, intercalação entre pares de bases ou actuação em enzimas as quais mantêm a integridade e função do ADN e do ARN; (2) agentes químicos que se ligam a proteínas para inibir a acção enzimática (e.g., antimetabolitos) ou a função de proteínas estruturais necessária à integridade celular (e.g., agentes antitubulina). Identificaram-se outros agentes químicos úteis para tratar alguns cancros que incluem fármacos que bloqueiam a acção hormonal esteróide no tratamento de cancro da próstata e da mama, agentes activados fotoquimicamente, sensibilizadores e protectores de radiação.

Os compostos de especial interesse neste invento são aqueles que afectam directamente a integridade da estrutura genética das células cancerosas. Polímeros de ácido nucleico tais como o ADN e o ARN são alvos importantes para os fármacos anticancro. Agentes alquilantes tais como mostardas de azoto, nitrosoureias e compostos contendo aziridina atacam directamente o ADN. Da mesma forma, compostos de coordenação de metais tais como a cisplatina e a carboplatina atacam

directamente a estrutura do ácido nucleico resultando em lesões difíceis para as células reparar, as quais, por sua vez, resultam em morte celular. Outros compostos que actuam nos ácidos nucleicos incluem moléculas de antraciclina tais como doxorrubicina, que se intercala entre pares de bases de ácido nucleico dos polímeros de ADN, bleomicina que causa quebras na cadeia de ácido nucleico, e falsos nucleósidos. Os falsos nucleósidos incluem análogos de nucleósidos de pirimidina e purina os quais são incorporados inapropriadamente em estruturas do polímero nucleico e acabam por causar a terminação prematura da cadeia de ADN. Certas enzimas que afectam a integridade e funcionalidade do genoma também podem ser inibidas em células cancerosas por determinados agentes químicos resultando na morte de células cancerosas. Aqueles incluem enzimas que actuam na ribonucleótido-redutase (e.g.. hidroxiureia; gemcitabina), topoisomerase I (e.g. camptotecina) e topoisomerase II (e.g., etoposido).

Entre estes fármacos anticancro dirigidos ao ADN, um dos mais vulgarmente usados é a cisplatina (cis-diaminadichloro-platina II, CDDP). Este composto é activo contra uma variedade de cancros humanos incluindo cancro do testículo, pulmão de células pequenas, bexiga, cervix, cabeça e pescoço.

Embora a actividade clínica dos agentes antiproliferativos actualmente aprovados contra muitas formas de cancro possa ser provada, ainda se procuram melhorias na rapidez de resposta do tumor, duração da resposta e, em última análise, sobrevivência do paciente. O invento aqui descrito demonstra a nova utilização do alcalóide cefalotaxina e seus análogos, incluindo a homo-harringtonina (HUT), os quais podem potenciar os efeitos antitumorais de fármacos quimioterapêuticos, em particular, de agentes que afectam a integridade de polímeros nucleicos tais como o ADN.

Visani *et al.* (*Leukemia*, 11; 624-628, 1997) divulga combinações de homo-harringtonina e citosina-arabinose (citabarina) ou IFN- α no tratamento de leucemia mieloide crónica.

Yuzhu *et al.* (resumo EMBASE, N° de Acesso: 1998384948, 1998) divulga combinações de homo-harringtonina e citosina arabinose (citabarina) ou aclarubicina no tratamento de leucemia mielóide crónica.

Laster, *et al.* (resumo EMBASE, N° de Acesso: 82182588, 1982) divulga combinações de homo-harringtonina e 5-fluorouracilo no tratamento de leucemia.

Zhang, *et al.* (*Asia Pacific J. Pharma.*, 7:191-19, 1992) a utilização de homo-harringtonina em combinação com metotrexato e verapamil para inibir o crescimento das células leucémicas P388 ou células de tumor ascítico.

Sumário do invento

Num aspecto, o presente invento proporciona a utilização de uma cefalotaxina e de um agente antiproliferativo na preparação de um medicamento para reduzir ou inibir o crescimento de um tumor sólido, em que a cefalotaxina proporciona um efeito quimiopotenciador.

Num outro aspecto, o presente invento proporciona composições farmacêuticas ou medicamentos que compreendem uma cefalotaxina e um agente antiproliferativo, em que o agente antiproliferativo é seleccionado do grupo que consiste de cisplatina, camptotecina, vinblastina, etoposido, amonafida, colchicina ou genisteína.

Descrição detalhada das figuras

A Figura 1 representa a estrutura geral de um análogo da cefalotaxina. R1 e R2 representam grupos de substituição. Apresentam-se as estruturas de R1 e R2 para o análogo da cefalotaxina, homo-harringtonina.

A Figura 2 representa a estrutura do análogo da cefalotaxina, homo-harringtonina.

A Figura 3 mostra o retardamento no crescimento do tumor, como volume de tumor nos dias após tratamento com HHT, HHT seguido de CDDP, ou apenas CDDP.

Descrição detalhada do invento

Proporcionam-se utilizações e composições médicas para o tratamento de um hospedeiro com um tumor sólido. Nas utilizações médicas em questão, uma cefalotaxina farmacologicamente aceitável é administrada, preferivelmente de uma forma sistémica, em conjunção com um agente antiproliferativo para melhorar os efeitos anticancro. A cefalotaxina proporciona um efeito quimio potenciador.

Os agentes são proporcionados em quantidades suficientes para reduzir ou inibir o crescimento de um tumor sólido. Numa concretização, o tratamento do tumor sólido proporciona um aumento no período de quadruplicação do volume do tumor (descrito adiante). Noutra concretização, a modulação de uma doença compreende um efeito quimiosensibilizador. Noutras concretizações, a modulação de uma doença compreende citostase. Ainda noutras concretizações, a modulação de uma doença compreende um efeito citotóxico.

Um agente químico é um “quimio potenciador” quando acentua o efeito de um conhecido fármaco antiproliferativo de uma maneira maior do que a soma das partes relativamente à actividade do quimio potenciador ou do agente antiproliferativo usados individualmente. Em alguns casos pode observar-se um efeito de quimiosensibilização. Este é definido como o efeito de utilizar um agente que, quando usado individualmente não demonstra efeitos antitumorais significativos, mas que melhora os efeitos antitumorais de um agente antiproliferativo relativamente à utilização do agente antiproliferativo por si só.

Como empregue aqui, o termo “cefalotaxina” inclui todos os membros da família química incluindo derivados de alcalóides da planta chinesa de folha perene, *Cephalotaxus fortunei*, e seus análogos. A família da cefalotaxina é definida pela mesma estrutura química que as estruturas de anel na Figura 1.

Um análogo da cefalotaxina é ainda definido mas não limitado pela estrutura representada na Figura 1, tendo substituintes ou grupos substitutos em R1 e R2. Exemplos de

R1 e/ou R2 incluem ésteres, incluindo harringtonina, iso-harringtonina, homo-harringtonina, desoxi-harringtonina, acetilcefalotaxina e similares. A Tabela 1 lista estruturas de R1 e R2 para alguns destes análogos. As substituições R1 e R2 são empregues tipicamente para melhorar a actividade biológica, as propriedades farmacêuticas tais como biodisponibilidade ou estabilidade, ou diminuir a toxicidade. Numa concretização, R1 e/ou R2 incluem substituições alquilo (e.g., metilo, etilo, propilo, etc.). Noutra concretização, R1 e/ou R2 incluem ésteres (e.g., metoxi, etoxi, butoxi, etc.). Porém, no âmbito deste invento, R1 e R2 não estão limitados aos exemplos anteriores.

Tabela 1	R1	R2
Iso-harringtonina	-OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CHCO}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{CO}_2^- \end{array}$
Harringtonina	-OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$
Acetilcefalotaxina	-OCH ₃	CH ₃ CO ₂ ⁻
Homo-harringtonina	-OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$

Um análogo da cefalotaxina é um refinamento químico adicional. Um exemplo específico de um análogo da cefalotaxina é a homo-harringtonina, que é o éster butanodioato da cefalotaxina, 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentil) (Figura 2).

Como empregue aqui, agentes antiproliferativos são compostos que induzem citostase ou citotoxicidade. "Citostase" é a inibição do crescimento das células enquanto "citotoxicidade" é definida como a morte de células. Exemplos específicos de agentes antiproliferativos incluem: antimetabolitos, tais como metotrexato, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, pentostatina, 6-mercaptopurina,

6-tioguanina, L-asparaginase, hidroxíureia, N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina, e floxuridina; agentes de proteínas estruturais, tais como alcalóides da vinca, incluindo vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, paclitaxel, e colchicina; antibióticos, tais como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, bleomicinas, plicamicina, e mitomicina; antagonistas de hormonas, tais como análogos do tamoxifeno e da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH); agentes que causam lesões a ácidos nucleicos tais como os agentes alquilantes mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, dacarbazina, metilnitrosourea, semustina (metil-CCNU), clorozotocina, busulfano, procarbazina, melfalano, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), e tiotepa, os agentes intercalantes doxorubicina, dactinomicina, daunorrubicina e mitoxantrona, os inibidores da topoisomerase etoposido, camptotecina e teniposido, e os complexos de coordenação de metais cisplatina e carboplatina.

Os seguintes exemplos são proporcionados como forma de ilustração.

Exemplos

Exemplo 1

Quimiopotentiação de Cisplatina (CDDP) por Homoharringtonina (HHT)

Fibrosarcomas murinos experimentais transplantáveis (2×10^5 células RIF-1) foram crescidos intradermicamente nos flancos de ratinhos C3H fêmeas com 3 meses (Charles River, Holister, CA). Quando os tumores atingiram um volume de aproximadamente 100 mm^3 , os ratinhos foram distribuídos aleatoriamente por grupos experimentais (4 ratinhos por grupo).

As composições experimentais foram preparadas como descrito na Tabela 2.

Tabela 2

Agente	Dose	Solvente	Fornecedor
Homo-harringtonina	2 mg/kg	DMSO	NCI
Cisplatina	4 mg/kg	Água para injeção	David Bull Labs

O quimiopotenciador homo-harringtonina foi obtido de NCI e feito à concentração apropriada em DMSO. Cisplatina (David Bull Laboratories, Mulgrave, Austrália, lote 5201844x) foi feita à concentração apropriada em água para injeção. As composições foram injectadas sistemicamente (*i.e.* intra-peritonealmente, *i.p.*), num volume de 100 microlitros. Para o tratamento do grupo 3, injectou-se o quimiopotenciador homo-harringtonina 30 minutos antes da injeção de cisplatina. Após tratamento, o crescimento dos tumores foi monitorizado três vezes por semana por medições com compasso calibrador de três diâmetros perpendiculares do tumor, calculando-se o volume de tumor através da fórmula:

$$V = \pi / 6 \times D_1 \times D_2 \times D_3,$$

onde D_{1-3} é em mm.

Os tumores foram seguidos até terem atingido um tamanho quatro vezes superior ao seu volume do dia zero de tratamento (TVQT), ou até 30 dias depois do tratamento, qual destes viesse primeiro. Os resultados estão expressos como “período de quadruplicação do volume de tumor” (TVQT) médio e “retardamento”. O TVQT médio é a média dos dias requeridos para os tumores individuais crescerem até a um volume de tumor quatro vezes superior ao volume de tumor do dia inicial de tratamento. “Retardamento” é a mediana dos dias requeridos para um tumor crescer até quatro vezes o tamanho médio do grupo tratado, menos a mediana dos dias requeridos para crescer até quatro vezes o tamanho médio do grupo controlo. Os resultados também estão expressos como a razão do período de quadruplicação do volume de tumor do tumor tratado em relação ao grupo controlo não tratado (TVQT/CTVQT). Valores crescentes desta razão indicam uma resposta antitumoral aumentada.

Os resultados estão apresentados na seguinte Tabela 3 e na Figura 3.

Tabela 3

Grupo	Tratamento	Dose (mg/kg)	TVQT Médio \pm E.P.	TVQT/CTVQT	Mediana (TVQT)	Retard. (Dias)
1	Controlo Não Tratado	-	8,3 \pm 0,4	1,0	8,6	0,00
2	Homo-harringtonina	2	10,1 \pm 0,4	1,2	9,8	1,20
3	Homo-harringtonina \rightarrow Cisplatina	2 \rightarrow 4	14,9 \pm 0,8	1,8	14,8	6,17
4	Cisplatina	4	12,9 \pm 1,1	1,5	12,5	3,83

A seta (\rightarrow) no Grupo 3 indica administração 30 minutos após administração de homo-harringtonina

Os resultados da Tabela 3 indicam que a actividade antiproliferativa da cisplatina é acentuada pela utilização do quimioterapêutico homo-harringtonina já que se observou um efeito maior do que a soma das partes quando se usaram ambos os compostos para tratar os ratinhos com tumores (grupo 3) em comparação com a utilização de apenas cisplatina (grupo 4) ou apenas homo-harringtonina (grupo 2).

Exemplo 2

Efeito da homo-harringtonina, isolada e em combinação com outros quimioterapêuticos, no crescimento do tumor RIF-1 em ratinhos C3H

Utilizou-se o modelo de tumor do fibrosarcoma murino RIF-1 para avaliar a actividade antitumoral da homo-harringtonina, isolada e em combinação com vários agentes antiproliferativos. Os agentes antiproliferativos usados incluem aqueles (e.g., cisplatina, citarabina, camptotecina, etoposido, 5-fluorouracilo, ou amonafida) que afectam a integridade dos ácidos nucleicos (e.g., ADN), agentes que actuam em proteínas estruturais (e.g., paclitaxel, vinblastina, ou colchicina) ou em enzimas citoplasmáticas (e.g., genisteína).

A homo-harringtonina (HHT-NCI) foi obtida de NCI em forma de pó. A homo-harringtonina (HHT-Clin) foi obtida do Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China), em frascos de 1 mL, pré-diluída com água a 1 mg/mL. A cisplatina para injeção, USP, foi obtida de David Bull Labs

(Mulgrave, Austrália), Lote No. 5201844x, na forma de um pó liofilizado. O paclitaxel foi obtido de Bristol Myers Squibb Co. (Princeton, NJ), Lote No. 9J16241, exp. Sep 2001, pré-diluído a 6 mg/mL em Cremaphor/EL. A citarabina foi obtida de Bedford Labs (Bedford, OH), Lote No. 86968A, exp. 6/02, na forma de um pó liofilizado. A camptotecina foi obtida de Boehringer-Ingelheim, Lote No. 142088, em forma de pó. A vinblastina foi obtida de Bedford Labs (Bedford, OH), Lote No. 112647, na forma de um pó liofilizado. Obteve-se etoposido de Pharmacia (Kalamazoo, MI), Lote No. ETA013, exp. 5/99, na forma de um líquido pré-diluído a 20 mg/mL. O 5-fluorouracilo foi obtido de Pharmacia (Kalamazoo, MI), Lote No. FFA191, exp. 7/00, na forma de um líquido pré-diluído a 50 mg/mL. A amonafida foi obtida de Penta Biotech (Union City, CA), Lote No.039-01, em forma de pó.

A colchicina foi obtida de Sigma (St. Louis, MO), Lote No. 55H0685, em forma de pó. A genisteína foi obtida de ChemCon GmbH (Freiburg i. Br.), Lote No. CC-6700-26, em forma de pó. Obteve-se DMSO de Sigma (St. Louis, MO), Lote No. 80K3695. Cloreto de Sódio a 0,9% para Injeção, USP (solução salina) foi produzido por Abbott Laboratories (Lote No. 55-199-DK). Água Esterilizada para Injeção, USP (WFI) foi produzida por Lyphomed, Inc. (Lote No. 390849).

Formulações: As preparações experimentais (grupos de tratamento) estão resumidas na Tabela 4.

Na preparação das formulações 1-4, pesou-se HHT-NCI em frasquinhos e dissolveu-se em DMSO nas concentrações indicadas.

Para a formulação 5, o conteúdo de um frasquinho de 10 mg de CDDP liofilizado (Cisplatina para Injeção) foi ressuspensão em 10 mL de WFI para se obter uma suspensão de CDDP a 1 mg/mL.

Para a formulação 6, paclitaxel, pré-diluído em Cremaphor/EL e álcool desidratado a 6 mg/mL, foi diluído adicionalmente para 3,3 mg/mL com WFI.

As formulações 7 e 8 foram preparadas pela diluição adicional de HHT-Clin com WFI até às concretizações indicadas. A formulação 9 era HHT-Clin não diluída, usada como recebida.

A formulação 10 foi preparada pela adição de 1 mL de WFI a 100 mg de citarabina na forma de pó liofilizado.

A formulação 11 foi preparada pela adição de DMSO a camptotecina até a uma concentração de 1 mg/mL.

A formulação 12 foi feita pela adição de Cloreto de Sódio a 0,9% para Injecção a um frasquinho de 10 mg de pó de vinblastina liofilizada.

As formulações 13-17 foram preparadas pela diluição da quantidade apropriada de cada agente de teste em solução salina (13-2,5 mg/mL de etoposido, 14-7,5 mg/mL de 5-fluorouracilo, 15-7,5 mg/mL de amonafida, 16-2,5 mg/mL de colchicina, 17-3,75 mg/mL de 5-fluorouracilo).

A formulação 18 foi preparada pela diluição de 15 mg de genisteína em 1 mL de DMSO.

Animais: No estudo utilizaram-se ratinhos C3H fêmeas (Charles River Laboratories, Holister, CA), com 3 meses aproximadamente. O peso corporal médio era aproximadamente de 25 g. Os animais foram mantidos em gaiolas isoladoras num ciclo de luz-escuro de 12 horas. Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*.

Tumores: A linha celular do fibrosarcoma murino RIF-1 foi mantida em cultura *in vitro* (meio de Waymouth suplementado com soro bovino fetal a 20%) a 37° C numa incubadora humidificada com CO₂ a 5%. Células RIF-1 na fase exponencial foram tripsinizadas e colhidas em matrizes de cultura de células para dar uma concentração de 4×10^6 células/mL e a seguir foram injectadas intradermicamente num volume de 50 µL (equivalente a 2×10^5 células por injecção) em ambos os flancos de cada ratinho. Nove dias mais tarde, quando os tumores tinham atingido um tamanho de aproximadamente 100 mm³, os animais foram distribuídos

aleatoriamente por diferentes grupos de tratamento.

Grupos de tratamento: Os grupos de tratamento estão resumidos na Tabela 4. Cada grupo de tratamento consistia de quatro a cinco animais. O volume de injeção intraperitoneal era de 100 µL. Deram-se injeções intratumorais (50 µL) num dos dois tumores de cada animal, com o tumor contralateral servindo como controlo não tratado. O volume de administração oral era de 100 µL. Administraram-se tratamentos combinando dois agentes de teste em duas injeções separadas, com a segunda imediatamente a seguir à primeira ou após 30 minutos.

Avaliação do período de quadruplicação do volume de tumor: Os tumores foram medidos três vezes por semana durante até 22 dias com compassos calibradores Vernier. O volume de tumor (milímetros cúbicos, mm³) foi calculado de acordo com a fórmula:

$$V = \pi / 6 \times D_1 \times D_2 \times D_3$$

na qual D_{1-3} são diâmetros perpendiculares medidos em milímetros (mm).

Utilizou-se o período de quadruplicação do volume de tumor (TVQT), definido como o tempo requerido para um tumor crescer até quatro vezes o seu volume inicial (na altura de tratamento), para identificar o fim do estudo. O TVQT foi determinado para todos os grupos de tratamento como a média \pm erro padrão (EP) expressa em dias.

A actividade antitumoral ou modulação do crescimento do tumor (como medido pelo crescimento retardado do tumor, *i.e.* aumento nos valores de TVQT) pela homo-harringtonina, administrada como agente único ou em combinação com outros quimioterapêuticos, está apresentada na Tabela 5.

Neste estudo estão incluídos resultados de oito testes separados. No teste E010, os tumores dos animais controlo não tratados quadruplicaram em tamanho numa média de 7,2 dias. A administração intraperitoneal de homo-harringtonina de NCI a 5 mg/Kg resultou num TVQT de 14,5 dias e a administração intratumoral de homo-harringtonina àquela dose resultou num

TVQT de 15,6 dias.

No teste E011, os animais controlo não tratados quadruplicaram em tamanho numa média de 8,3 dias enquanto a administração intraperitoneal de homo-harringtonina de NCI a 2 mg/Kg prolongou o TVQT médio para 10,1 dias, e a administração intraperitoneal adicional de CDDP prolongou ainda mais o TVQT médio para 14,9 dias. Embora paclitaxel por si só (10 mg/Kg) demonstrasse um TVQT de 8,8 dias, a adição de homo-harringtonina (2 mg/kg) não alterou o TVQT, tornando o paclitaxel no único agente com actividade combinatória inferior àquela da homo-harringtonina isolada.

Nos restantes estudos de combinação utilizou-se homo-harringtonina de Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China), formulada em água esterilizada a 2 mg/Kg ou 4 mg/Kg.

A 2 mg/Kg, a homo-harringtonina apresentava um TVQT médio de 10,4 dias em E026 enquanto os controlos não tratados quadruplicaram em 7,4 dias. A administração da combinação da cisplatina (4 mg/Kg) com homo-harringtonina (2 mg/Kg) originou um TVQT de 11,1 dias, o qual era superior ao da homo-harringtonina (TVQT = 10,4 dias) ou da cisplatina (TVQT = 9,4 dias) isoladas.

No teste E030, onde os controlos não tratados quadruplicaram em 6,7 dias, o tratamento com homo-harringtonina (2 mg/Kg) originou um TVQT de 7,9 dias e a camptotecina ou citarabina resultaram em TVQTs de 9,4 ou 7,6 dias, respectivamente. A administração da combinação de homo-harringtonina (2 mg/Kg) com camptotecina (6 mg/Kg) ou citarabina (400 mg/Kg) aumentou os TVQTs para 10,1 e 8,6 dias, respectivamente.

Em E032, onde os controlos não tratados quadruplicaram em 6,5 dias, a homo-harringtonina a 4 mg/Kg apresentava um TVQT médio de 8,5 dias. A administração de homo-harringtonina (4 mg/Kg) em combinação com 5-fluorouracilo (30 mg/Kg) resultou num TVQT de 17,9 dias *versus* 13,6 dias para o 5-fluorouracilo isolado. A administração da combinação de homo-harringtonina (4 mg/Kg) e vinblastina (2 mg/Kg) originou

um TVQT de 10,9 dias *versus* 8,6 dias para a vinblastina isolada. A administração da combinação de homo-harringtonina (4 mg/Kg) e cisplatina (4 mg/Kg) ou amonafida (30 mg/Kg) resultou em TVQTs de 10,4 e 10,2 dias, respectivamente, *versus* 9,9 e 7,6 dias para aqueles agentes isolados. A homo-harringtonina em combinação com etoposido (10 mg/Kg) deu um TVQT de 8,7 dias enquanto o etoposido isolado resultou em 8,5 dias.

A colchicina administrada oralmente (10 mg/Kg), em E033, resultou num TVQT de 6,3 dias, enquanto os controlos não tratados e a homo-harringtonina (4 mg/Kg) deram TVQTs de 7,8 e 8,3 dias. A homo-harringtonina combinada com colchicina a estas doses aumentou o TVQT para 9,4 dias.

Em E036, a genisteína (60 mg/Kg) combinada com homo-harringtonina (4 mg/Kg) apresentava um TVQT de 9,2 dias, o qual era superior ao da genisteína isolada (7,1 dias).

Em alguns grupos houve mortes de animais que foram registadas como se segue. Três entre quatro ratinhos morreram após tratamento com homo-harringtonina obtida de NCI e formulada em DMSO a 1,25 mg/mL. Dois entre cinco ratinhos morreram após receberem esta formulação intratumoralmente. Quatro entre quatro ratinhos morreram após tratamento com esta mesma homo-harringtonina formulada a 2,5 mg/mL em DMSO. A combinação de homo-harringtonina (0,5 mg/mL) em DMSO com paclitaxel (2,5 mg/mL) foi letal para dois entre quatro ratinhos, e a combinação de homo-harringtonina (0,5 mg/mL) em DMSO com cisplatina (1 mg/mL) foi letal para um entre quatro ratinhos. A combinação de homo-harringtonina (1 mg/mL) em vinblastina (0,5 mg/mL) foi letal para um entre quatro ratinhos que receberam tratamento, e a combinação de homo-harringtonina (1 mg/mL) e genisteína (15 mg/mL) foi letal para dois entre cinco ratinhos.

Em resumo, a administração intraperitoneal de homo-harringtonina resultou em actividade antitumoral, i.e. modulou o crescimento de tumores, no modelo de tumor do

fibrosarcoma murino RIF-1. A administração intraperitoneal de homo-harringtonina em combinação com cisplatina, citarabina, camptotecina, vinblastina, etoposido, 5-fluorouracilo, amonafida, colchicina e genisteína exibiu níveis de actividade antitumoral superiores aos da homo-harringtonina isolada, ou dos agentes de teste individuais. A melhor actividade combinatória empregava 5-fluorouracilo, amonafida e vinblastina. A homo-harringtonina em combinação com paclitaxel resultou em actividade antitumoral inferior à da homo-harringtonina isolada. A homo-harringtonina obtida de NCI e formulada em DMSO exibia alguma toxicidade letal enquanto a homo-harringtonina obtida de Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China) e formulada em água esterilizada para utilização em humanos não exibia toxicidade letal às doses utilizadas.

Tabela 4

Sumário dos grupos de tratamento

Formu- lação	Tratamento	Concentração (mg/mL)	Via de Administração	Volume de Injecção (µL)
1	HHT-NCI em DMSO	1,25	IP	100
2	HHT-NCI em DMSO	2,5	IP	100
3	HHT-NCI em DMSO	2,5	IT	50
4	HHT-NCI em DMSO	0,5	IP	100
5	CDDP em WFI	1	IP	100
6	Paclitaxel em WFI	2,5	IP	100
7	HHT-Clin em WFI	0,5	IP	100
8	HHT-Clin em WFI	0,25	IP	100
9	HHT-Clin em WFI	1	IP	100
10	Citarabina em WFI	100	IP	100
11	Camptotecina em DMSO	2,5	IP	100
12	Vemblastina em sol. salina	0,5	IP	100
13	Etoposido em sol. salina	2,5	IP	100
14	5-Fluorouracilo solução salina	7,5	IP	100
15	Amonafida em sol. salina	7,5	IP	100
16	Colchicina em sol. salina	2,5	PO	100
17	5-Fluorouracilo solução salina	3,75	IP	100
18	Genisteína em DMSO	15	IP	100

Tabela 5

Efeito da homo-harringtonina e da homo-harringtonina combinada com outros quimioterapêuticos no crescimento do tumor RIF-1 em ratinhos C3H

Exp. #	Formulação	Tratamento	# de Tumores	TVQT (dias) (Média ± EP)
E010	-	Control não tratado	8	7,2 ± 0,1
E010	1	HHT-NCI (5 mg/kg)	2*	14,5 ± 0,9
E010	2	HHT-NCI (10 mg/Kg)	0*	Morreram todos
E010	3	HHT-NCI (5 mg/Kg)	3*	15,6 ± 1,8
E011		Controlo não tratado	8	8,3 ± 0,4
E011	4	HHT-NCI (2 mg/Kg)	8	10,1 ± 0,4
E011	5	CDDP (4 mg/Kg)	8	12,9 ± 1,1
E011	4,5	HHT-NCI-30'-CDDP	6*	14,9 ± 0,8
E011	6	Paclitaxel (10 mg/Kg)	8	8,8 ± 0,4
E011	4,6	HHT-30'-Paclitaxel	4*	8,8 ± 0,4
E026	-	Controlo não tratado	8	7,4 ± 0,3
E026	7	HHT-Clin (2 mg/Kg)	8	10,4 ± 1,0
E026	5	CDDP (4 mg/Kg)	8	9,4 ± 0,5
E026	7,5	HHT-Clin + CDDP	8	11,1 ± 0,4
E026	7,5	HHT-Clin-30'-CDDP	8	10,1 ± 0,4
E028	-	Control não tratado	8	8,7 ± 0,5
E028	8	HHT-Clin (1 mg/Kg)	8	9,2 ± 0,7
E028	9	HHT-Clin (4 mg/Kg)	8	10,1 ± 0,4
E030	-	Controlo não tratado	8	6,7 ± 0,4
E030	7	HHT-Clin (2 mg/Kg)	8	7,9 ± 0,3
E030	10	Citarabina (400 mg/Kg)	8	7,6 ± 0,2
E030	7,10	HHT-Clin + Citarabina	8	8,6 ± 0,4
E030	11	Camptotecina (6 mg/Kg)	8	9,4 ± 0,4
E030	7,11	HHT-Clin + Camptotecina	8	10,1 ± 0,6
E032	-	Controlo não tratado	8	6,5 ± 0,6
E032	9	HHT-Clin (4 mg/Kg)	8	8,5 ± 0,5
E032	5	CDDP (4 mg/Kg)	8	9,9 ± 0,6
E032	9,5	HHT-Clin+CDDP	8	10,4 ± 0,4
E032	12	Vinblastina (2 mg/Kg)	8	8,6 ± 0,4
E032	9,12	HHT-Clin + Vinblastina	6*	10,9 ± 0,4
E032	13	Etoposido (10 mg/Kg)	8	8,5 ± 1,0
E032	9,13	HHT-Clin + Etoposido	8	8,7 ± 0,5
E032	14	5-Fluorouracilo (30 mg/Kg)	8	13,6 ± 1,9
E032	9,14	HHT-Clin + 5-Fluorouracilo	8	17,9 ± 0,7
E032	15	Amonafida (30 mg/Kg)	8	7,6 ± 0,4
E032	9,15	HHT-Clin + Amonafida	8	10,2 ± 0,5
E033	-	Controlo não tratado	8	7,8 ± 0,6
E033	9	HHT-Clin (4 mg/Kg)	8	8,3 ± 0,4
E033	16	Colchicina (10 mg/Kg)	8	6,3 ± 0,3
E033	9,16	HHT-Clin + Colchicina	8	9,4 ± 0,5
E033	17	5-Fluorouracilo (15 mg/Kg)	8	6,7 ± 0,4
E033	9,17	HHT-Clin + 5-Fluorouracilo	8	8,6 ± 0,3
E036	-	Controlo não tratado	8	6,8 ± 0,4
E036	18	Genisteína (60 mg/Kg)	8	7,1 ± 0,4
E036	9,18	HHT-Clin + Genisteína	6*	9,2 ± 0,5

* Ocorreram mortes de animais nestes grupos. Refira-se ao texto para os pormenores.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma cefalotaxina e de um agente antiproliferativo para a preparação de um medicamento para reduzir ou inibir o crescimento de um tumor sólido, em que a cefalotaxina proporciona um efeito quimiopotenciador.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida cefalotaxina compreende homo-harringtonina.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida cefalotaxina compreende um análogo de homo-harringtonina.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido agente antiproliferativo compreende um agente que interage com ácidos nucleicos.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido agente antiproliferativo compreende um agente alquilante, um agente intercalante, um complexo de metal de coordenação, um nucleósido de pirimidina, um nucleósido de purina, um inibidor de enzimas associadas a ácido nucleico, ou um inibidor de proteínas associadas a ácido nucleico.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido antiproliferativo compreende cisplatina, citarabina, camptotecina, vinblastina, etoposido, 5-fluorouracilo, amonafida, colchicina ou genisteína.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido medicamento compreende um medicamento de cefalotaxina e um medicamento antiproliferativo e em que o referido medicamento de cefalotaxina é administrado antes da administração do referido medicamento antiproliferativo.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido medicamento compreende um medicamento de cefalotaxina e um medicamento antiproliferativo, e em que o referido medicamento de cefalotaxina é administrado durante a administração do referido medicamento antiproliferativo.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido medicamento compreende um medicamento de cefalotaxina e um medicamento antiproliferativo e em que o referido medicamento de cefalotaxina é administrado após a administração do referido medicamento antiproliferativo.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a modulação do referido tumor sólido com o referido medicamento é superior à do referido agente antiproliferativo isolado.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida redução ou inibição do crescimento de um tumor sólido compreende um aumento do tempo para o tumor crescer quatro vezes o volume de tumor após tratamento inicial.

12. Composição farmacêutica que compreende uma cefalotaxina e um agente antiproliferativo, em que o referido agente antiproliferativo é seleccionado do grupo que consiste em cisplatina, camptotecina, vinblastina, etoposido, amonafida, colchicina ou genisteína.

13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, em que a referida cefalotaxina compreende homo-harringtonina ou um análogo da homo-harringtonina.

14. Medicamento que compreende uma cefalotaxina e um agente antiproliferativo, em que o agente antiproliferativo é seleccionado do grupo que consiste em cisplatina, camptotecina, vinblastina, etoposido, amonafida, colchicina ou genisteína.

15. Medicamento de acordo com a reivindicação 14, em que a referida cefalotaxina compreende homo-harringtonina ou um análogo da homo-harringtonina.

Lisboa,

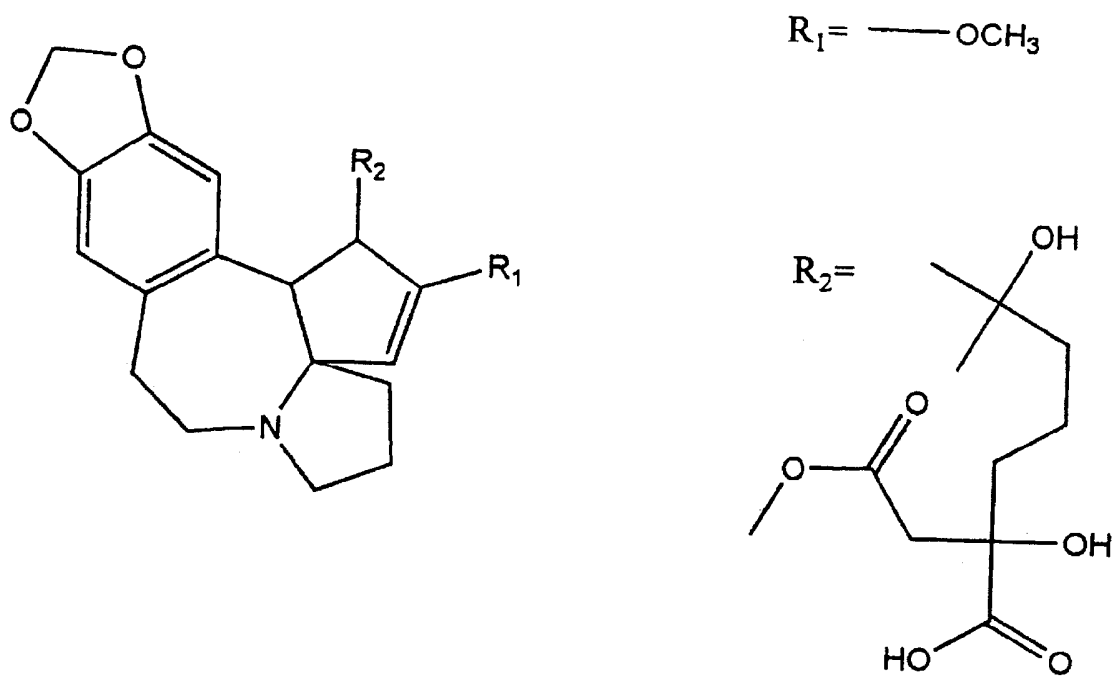


FIGURA 1

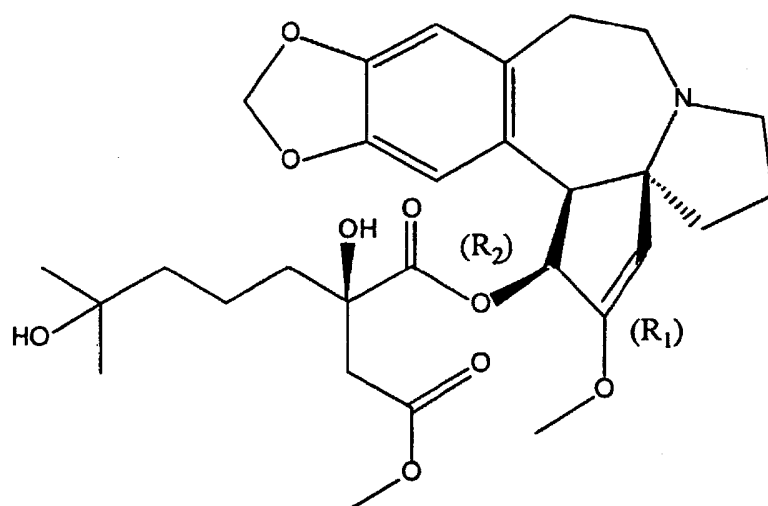


FIGURA 2

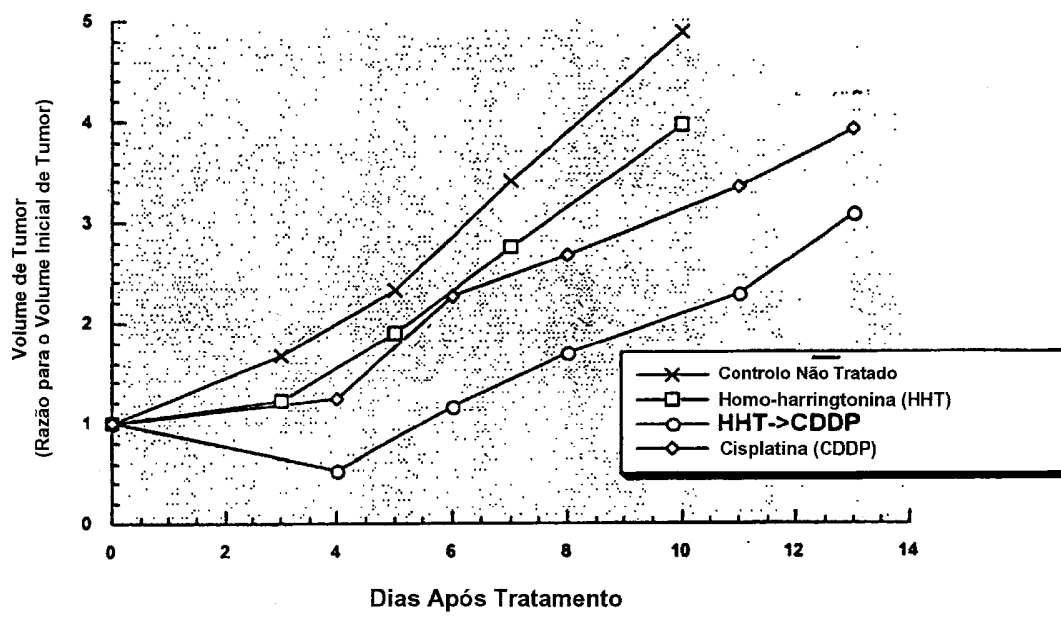


FIGURA 3