

(22) Data de pedido: 1997.11.04	(73) Titular(es): THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION 300 LONGWOOD AVENUE BOSTON, MASSACHUSETTS 02115 US
(30) Prioridade(s): 1996.11.05 US 28708 P 1997.11.03 US 963058	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.05.14	(72) Inventor(es): ROBERT J. D'AMATO US
(45) Data e BPI da concessão: 2011.01.05 019/2011	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA A INIBIÇÃO DE ANGIOGÉNESE**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO COMPREENDE UM GRUPO DE COMPOSTOS QUE INIBEM EFICAZMENTE A ANGIOGÉNESE. MAIS CONCRETAMENTE, A TALIDOMIDA E VÁRIOS COMPOSTOS AFIM, TAIS COMO PRECURSORES, ANÁLOGOS, METABOLITOS E PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA TALIDOMIDA, MOSTRARAM INIBIR A ANGIOGÉNESE E TRATAR ESTADOS DE DOENÇA RESULTANTES DA ANGIOGÉNESE. POR OUTRO LADO, DROGAS ANTI-INFLAMATÓRIAS, TAIS COMO ESTERÓIDES E NÃO ESTERÓIDES (NSAID) PODEM INIBIR DOENÇAS DEPENDENTES DE ANGIOGÉNESE TANTO ISOLADOS COMO COMBINADOS COM TALIDOMIDA E COMPOSTOS AFIM. IMPORTANTE, ESSES COMPOSTOS PODEM SER ADMINISTRADOS ORALMENTE.

RESUMO

"Composições para a inibição de angiogénese"

O presente invento compreende um grupo de compostos que inibem eficazmente a angiogénese. Mais concretamente, a talidomida e vários compostos afim, tais como precursores, análogos, metabolitos e produtos de hidrólise da talidomida, mostraram inibir a angiogénese e tratar estados de doença resultantes da angiogénese. Por outro lado, drogas anti-inflamatórias, tais como esteróides e não esteróides (NSAID) podem inibir doenças dependentes de angiogénese tanto isolados como combinados com talidomida e compostos afim. Importante, esses compostos podem ser administrados oralmente.

DESCRIÇÃO

"Composições para a inibição de angiogénese"

O presente invento refere-se a talidomida e a dexametasona para utilizar no tratamento de um tumor sólido ou originário no sangue.

Antecedentes do Invento

Conforme é aqui utilizado, o termo "angiogénese" significa a criação de novos vasos sanguíneos num tecido ou órgão. Em condições fisiológicas normais, os seres humanos e os animais sofrem angiogénese só em situações específicas muito restritas. Por exemplo, normalmente observa-se angiogénese na cicatrização de lesões, desenvolvimento fetal e embrionário e formação do corpo lúteo, endométrio e placenta. O controlo de angiogénese é um sistema muitíssimo regulado de estimuladores e inibidores angiogénicos.

Verificou-se que o controlo da angiogénese altera-se em determinados estados de doença e, em muitos casos, o dano patológico associado à doença relaciona-se com angiogénese incontrolada.

Pensa-se que a angiogénese controlada e a angiogénese incontrolada se processam de forma semelhante. Células endoteliais e pericitos, rodeados por uma membrana basal, formam vasos sanguíneos capilares. A angiogénese começa com a erosão da membrana basal por enzimas libertadas por células endoteliais e leucócitos. As células endoteliais, que revestem o lúmen de vasos sanguíneos, projectam-se então através da membrana basal. Os estimulantes angiogénicos induzem a migração das células endoteliais através da membrana basal erodida. As células migratórias formam "brotos" emergentes dos vasos sanguíneo progénies, onde as células endoteliais sofrem mitose e proliferam. Os "brotos" endoteliais fundem-se uns com os outros para formarem loops capilares, criando o novo vaso sanguíneo. No estado de doença, a prevenção da angiogénese pode afastar danos causados pela invasão do novo sistema microvascular.

Ocorre angiogénese desregulada, persistente, numa multiplicidade de estados de doença, metástase tumoral e crescimento anormal de células endoteliais e apoia os danos patológicos observados nesses problemas. Agruparam-se os diversos estados patológicos criados devido a angiogénese desregulada em doenças dependentes da angiogénese ou associadas a angiogénese. As terapias direccionadas para o controlo dos processos angiogénicos podem conduzir à anulação ou ao alívio dessas doenças.

Um exemplo de uma doença mediada por angiogénese é a doença neovascular ocular. Esta doença caracteriza-se pela invasão de novos vasos sanguíneos nas estruturas do olho, tal como na retina ou na córnea. É a causa mais comum de cegueira e está envolvida em aproximadamente vinte doenças oftálmicas. Na degeneração macular relacionada com a idade, os problemas visuais associados são causados por um ingresso de capilares coroidais através de defeitos na membrana de Bruch com proliferação de tecido fibrovascular sob o epitélio pigmentar da retina. O dano angiogénico está também associado a retinopatia diabética, retinopatia da prematuridade, rejeição de enxerto córneo, glaucoma neovascular e fibroplasia retrolenticular. Outras doenças associadas com neovascularização da córnea incluem, embora não se limitando a essas, ceratoconjuntivite epidémica, deficiência em vitamina A, uso excessivo de lentes de contacto, ceratite atópica, ceratite límbica superior, ceratite *sicca* de pterígio, síndrome de Sjogren, acne rosácea, flictenulose, sífilis, infecções por micobactérias, degeneração de lípidos, queimaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecções por *Herpes simplex*, infecções por *Herpes zoster*, infecções por protozoários, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneração marginal de Terrien, ceratólise marginal, artrite reumatóide, lúpus sistémico, poliarterite, trauma, sarcoidose de Wegener, Esclerite, doença de Steven-Johnson, ceratotomia radial, penfigóide e rejeição do enxerto de córnea.

As doenças associadas com neovascularização da retina/coróide incluem, embora não se limitem a essas, retinopatia diabética, degeneração macular, anemia das células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico,

doença de Paget, oclusão de veias, oclusão de artérias, doença obstrutiva da carótida, uveíte/ vitrite crónica, infecções por micobactérias, doença de Lyme, lúpus eritematoso sistémico, retinopatia de prematuridade, doença de Eale, doença de Behcet, infecções que causam uma retinite ou coroidite, histoplasmoze ocular presumida, doença de Best, miopia, fossetas ópticas, doença de Stargardt, pars planite, descolamento crónico da retina, síndromes de hiperviscosidade, toxoplasmoze, trauma e complicações após laser. Outras doenças incluem, embora não se limitem a essas, doenças associadas a rubeose (neovascularização do ângulo) e doenças causadas por proliferação anormal de tecido fibrovascular ou fibroso, incluindo todas as formas de vitreorretinopatias proliferativas.

Uma outra doença na qual se acredita que a angiogénese está envolvida é a artrite reumatóide. Os vasos sanguíneos no revestimento sinovial das articulações sofrem angiogénese. Em adição à formação de novas redes vasculares, as células endoteliais libertam factores e espécies reactivas de oxigénio que conduzem ao crescimento de *pannus* e à destruição da cartilagem. Os factores envolvidos na angiogénese podem contribuir activamente para, e ajudar a manter, o estado cronicamente inflamado da artrite reumatóide.

Os factores associados à angiogénese podem também desempenhar um papel na osteoartrite. A activação dos condrócitos pelos factores relacionados com angiogénese contribui para a destruição da articulação. Numa fase posterior, os factores angiogénicos promovem a formação de osso novo. A intervenção terapêutica que previne a destruição do osso pode reter a progressão da doença e proporcionar alívio aos indivíduos que sofrem de artrite.

A inflamação crónica pode também envolver angiogénese patológica. Estados de doença como a colite ulcerativa e a doença de Crohn apresentam alterações histológicas com o ingresso de novos vasos sanguíneos no tecido inflamado. A bartonelose, uma infecção bacteriana encontrada na América do Sul, pode resultar numa fase crónica que se caracteriza pela proliferação de células endoteliais vasculares. Um

outro papel patológico associado a angiogénese é encontrado em aterosclerose. As placas formadas no lúmen dos vasos sanguíneos mostraram possuir actividade estimulatória angiogénica.

Uma das doenças angiogénicas mais frequentes da infância é o hemangioma. Na maioria dos casos, os tumores são benignos e regredem sem intervenção. Nos casos mais graves, os tumores progridem para grandes formas cavernosas e infiltrativas e criam complicações clínicas. As formas sistémicas de hemangiomas, as hemangiomatoses, possuem uma elevada taxa de mortalidade. Existem hemangiomas resistentes à terapia que não podem ser tratados com os agentes terapêuticos correntemente em uso.

A angiogénese é também responsável por danos encontrados em doenças hereditárias tais como a doença de Osler-Weber-Rendu, ou telangiectasia hemorrágica hereditária. Esta é uma doença hereditária que se caracteriza por múltiplos pequenos angiomas, tumores de vasos sanguíneos ou linfáticos. Os angiomas encontram-se na pele e membranas mucosas, muitas vezes acompanhados por epistaxe (hemorragia nasal) ou hemorragia gastrointestinal e algumas vezes com fístula arteriovenosa pulmonar ou hepática.

A angiogénese é proeminente na formação de tumores sólidos e metástases. Encontraram-se factores angiogénicos associados a vários tumores sólidos tais como, rabdomiossarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, e osteossarcoma. Um tumor não pode expandir sem fornecimento de sangue para proporcionar nutrientes e remover os resíduos celulares. Os tumores nos quais a angiogénese é importante incluem os tumores sólidos, e tumores benignos tais como neuroma do acústico, neurofibroma, tracoma e granulomas piogénicos. A prevenção de angiogénese pode reter o crescimento desses tumores e os danos resultantes para o animal devido à presença do tumor.

Deve salientar-se que a angiogénese foi associada a tumores originários no sangue, tais como leucemias, qualquer das várias doenças neoplásicas agudas ou crónicas da medula óssea, nas quais ocorre proliferação desenfreada de glóbulos

brancos, acompanhada usualmente por anemia, coagulação sanguínea deficiente, e aumento dos nódulos linfáticos, fígado e baço. Acredita-se que a angiogénese desempenha um papel nas anormalidades na medula óssea que dão origem a tumores do tipo leucemia.

A angiogénese é importante em dois estádios da metástase de tumores. O primeiro estágio onde o estímulo da angiogénese é importante é a vascularização do tumor, que permite que as células tumorais entrem na corrente sanguínea e circulem através do corpo. Depois de as células de tumor terem deixado o primeiro local, e se terem instalado num segundo, o local de metástase, tem de ocorrer angiogénese antes de o novo tumor poder crescer e expandir. Deste modo, a prevenção da angiogénese pode conduzir à prevenção de metástases dos tumores e possivelmente conter o crescimento neoplástico no primeiro local.

O conhecimento do papel da angiogénese na manutenção e metástase de tumores conduziu a um indicador prognóstico para o cancro da mama. A quantidade de neovascularização encontrada no primeiro tumor foi determinada pela contagem da densidade de microvasos na área da neovascularização mais intensa em carcinoma mamário invasivo. Verificou-se uma correlação entre um elevado nível de densidade de microvasos e a recorrência de tumor. O controlo da angiogénese através de meios terapêuticos pode possivelmente conduzir à cessação da recorrência dos tumores.

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

Na cicatrização de lesões, a reparação excessiva ou fibroplasia pode ser um efeito secundário prejudicial de procedimentos cirúrgicos e pode ser causada ou exacerbada pela angiogénese. As aderências são complicações frequentes de cirurgia e conduzem a problemas tais como obstrução do intestino delgado.

Foram utilizados vários tipos de compostos para prevenir a angiogénese. Taylor et al. utilizaram protamina para inibir a angiogénese, ver Taylor et al., Nature 297:307 (1982). A toxicidade da protamina limita a sua utilização prática como agente terapêutico. Folkman et al. apresentaram a utilização de heparina e de esteróides para controlar a angiogénese. Ver Folkman et al., Science 221:719 (1983) e as Patentes dos Estados Unidos da América N.º 5001116 e N.º 4994443. Verificou-se que esteróides, tal como o tetrahydrocortisol, que não tem actividade gluco- e mineralocorticóide, são inibidores angiogénicos.

Verificou-se que outros factores encontrados endogenamente em animais, tal como a glicoproteína de 4kDa de humor vítreo de bovino e um factor derivado de cartilagem, inibem a angiogénese. Os factores celulares tais como interferão inibem a angiogénese. Por exemplo, o interferão α ou o interferão β humano mostraram inibir a angiogénese induzida pelo tumor em derme de ratinho estimulada por células neoplásticas humanas. O interferão β é também um potente inibidor de angiogénese induzida por células de baço alogénicas. Ver Sidky et al., Cancer Research 47:5155-5161 (1987). Referiu-se que o interferão α recombinante humano (alfa/A) foi usado com sucesso no tratamento de hemangiomatose pulmonar, uma doença induzida por angiogénese. Ver White et al., New England J. Med. 320:1197-1200 (1989).

Outros agentes que foram utilizados para inibir a angiogénese incluem éteres de ácido ascórbico e compostos relacionados. Ver Kokai Tokkyo Koho N.º 58-131978 japonesa. O polissacarídeo sulfatado DS 4152 também apresenta inibição angiogénica. Ver Kokai Tokkyo Koho N.º 63-119500 japonesa. Um produto fúngico, a fumagilina, é um potente agente angiostático *in vitro*. O composto é tóxico *in vivo*, mas utilizou-se *in vivo* um derivado sintético, o AGM 12470, para tratar artrite de colagénio II. A fumagilina e os derivados de fumagilina substituídos no oxigénio são apresentados nos Pedidos de EPO N.º 0325199A2 e N.º 0357061A1.

O Pedido de PCT N.º WO 92/14455 para Kaplan et al. está direccionado para um método para controlar a concentração

anormal de TNF- α através da administração de talidomida ou de derivados de talidomida a um paciente com concentrações tóxicas de TNF- α .

Os compostos anteriores são agentes terapêuticos tópicos ou injectáveis. Deste modo, existem inconvenientes à sua utilização como inibidor angiogénico geral e falta-lhes potência adequada. Por exemplo, na prevenção de excessiva cicatrização de ferimentos, a cirurgia em órgãos internos do corpo envolve incisões em várias estruturas contidas nas cavidades do corpo. Esses ferimentos não são acessíveis a aplicações locais de inibidores angiogénicos. Os sistemas de entrega local envolvem também curativos frequentes que são impraticáveis em ferimentos internos, e aumentam o risco de infecção ou prejuízo em tecido de granulação delicados nos ferimentos de superfície.

Deste modo, necessita-se de um método e de uma composição que consigam inibir angiogénese e que sejam facilmente administrados. Um método simples e eficaz de tratamento seria por via oral. Se um inibidor angiogénico pudesse ser administrado por via oral, os muitos tipos de doença anteriormente discutidos, e outras patologias dependentes da angiogénese, poderiam ser tratados facilmente. A dosagem óptima poderia ser distribuída numa forma que o paciente podia auto-administrar.

É um objecto do presente invento proporcionar um tratamento para tumores sólidos.

É um outro objecto do presente invento proporcionar um método e composição para o tratamento de tumores originários no sangue, tal como a leucemia.

É um outro objecto do presente invento proporcionar um método e composição para o tratamento de hemangioma.

É um outro objecto do presente invento proporcionar um método e composição para o tratamento de sarcoma de Kaposi.

Ainda um outro objecto do presente invento é proporcionar um método e composição compreendendo talidomida e fármacos anti-inflamatórios esteróides para o tratamento de cancro.

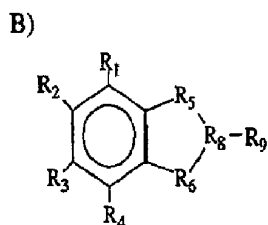
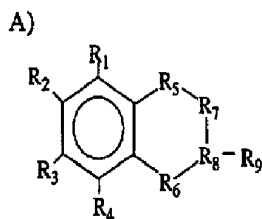
Estes e outros objectos, características e vantagens do presente invento tornar-se-ão evidentes após uma revisão da descrição detalhada das concretizações apresentadas e das reivindicações anexadas, que se seguirão.

Num primeiro aspecto do invento, proporciona-se talidomida e dexametasona para utilizar no tratamento de um tumor sólido ou originário no sangue, onde a talidomida e a dexametasona são administradas simultaneamente a um ser humano ou a um animal.

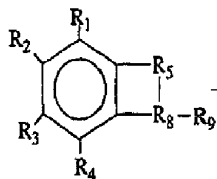
Num segundo aspecto do invento proporciona-se talidomida e dexametasona para utilizar no tratamento de um tumor sólido ou originário no sangue, onde a talidomida e a dexametasona são administradas sequencialmente a um ser humano ou a um animal.

Concretizações do invento em quaisquer dos seus vários aspectos encontram-se descritas a seguir ou definidas nas reivindicações.

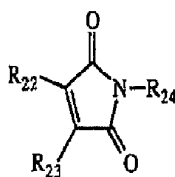
As Figuras de 1 a 3 são uma listagem de compostos representativos do género representado pelas seguintes fórmulas gerais:



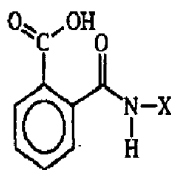
C)



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



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



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

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

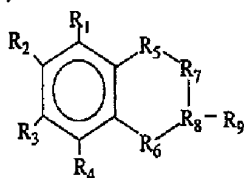
A Figura 8 mostra o efeito de talidomida, sulindac, ou de uma combinação dos dois, na inibição do crescimento tumoral de V2-carcinoma em coelhas brancas da Nova Zelândia.

Descrevem-se composições e métodos para o tratamento de doenças que são mediadas por angiogénese. Descreve-se aqui a utilização de talidomida ou dos metabolitos de talidomida para inibir angiogénese indesejada. Descrevem-se também compostos que causam dismelia no feto em desenvolvimento e possuem actividade antiangiogénica. Descreve-se também um método de tratamento de angiogénese indesejada num ser

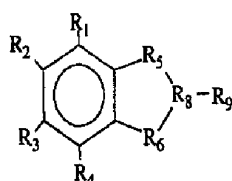
humano ou num animal, compreendendo os passos de administrar ao ser humano ou ao animal com angiogénese indesejada uma composição contendo uma quantidade eficaz de um composto teratogénico que é antiangiogénico.

Os compostos que podem ser utilizados incluem os compostos incluídos nas fórmulas gerais que se seguem. Exemplos de compostos que possuem propriedades antiangiogénicas possuindo uma das seguintes três fórmulas (A), (B), ou (C):

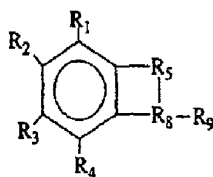
A)



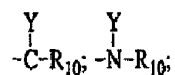
B)



C)

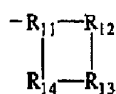


Nas fórmulas anteriores, A), B), e C), R_1 , R_2 , R_3 e R_4 podem ser seleccionados de: $-H$; $-OH$; $=O$, alcanos, alcenos ou alcinos de cadeia linear ou ramificada; alcanos, alcenos ou alcinos cíclicos; combinações de alcanos, alcenos e alcinos cíclicos e acíclicos; álcool, aldeído, cetona, ácidos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

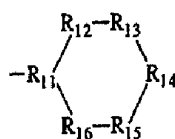


ou -O- onde Y é opcional e é o mesmo que foi anteriormente definido para R₁; e R₁₀ é o mesmo que foi anteriormente definido para R₁, ou quando Y está ausente, R₁₀ é =O; e R₉ é uma porção possuindo a fórmula D), E), F), G) ou H):

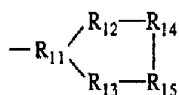
D)



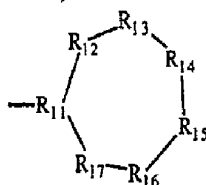
F)



E)

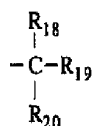


G)

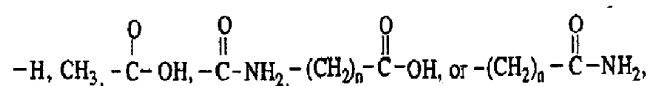


onde cada um de R₁₁ - R₁₇ é independentemente o mesmo que foi anteriormente definido para R₅;

H)



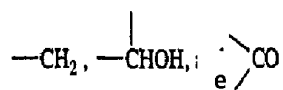
onde R₁₈, R₁₉ e R₂₀ são, independentemente seleccionados de



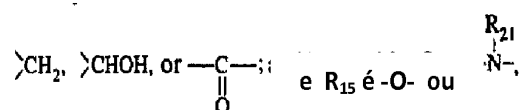
e n=1 a 4.

Em conformidade, descreve-se a inibição de angiogénese num mamífero pela administração de uma composição terapêutica compreendendo um dos compostos anteriormente descritos numa dosagem suficiente para inibir a angiogénese.

O composto pode possuir a fórmula B), onde R_5 e R_6 são seleccionados do grupo que consiste em:

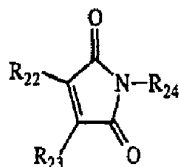


e R_9 possui a fórmula F) ou H); e R_{14} e R_{16} seleccionados do grupo que consiste em:



onde R_{21} é -H, -CH₃, ou -OH. Compostos preferidos específicos incluem talidomida, os seus precursores, metabolitos e análogos. Os análogos incluem, em particular, o EM-12, o ácido N-ftaloil-DL-glutâmico (PGA) ou o anidrido N-ftaloil-DL-glutamina. Exemplos de compostos que são membros deste género encontram-se listados nas Figuras 1 a 3.

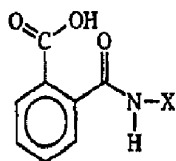
Compostos da fórmula que se segue que possuem propriedades antiangiogénicas:



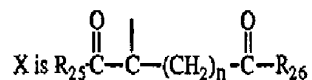
onde R_{22} e R_{23} são (independentemente) -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, ou -CH₂-CH₃; e R_{24} é -H, -CH₃, ou -CH₂-CH₃.

Apresenta-se também a inibição de angiogénese num mamífero, pela administração de um composto em conformidade com as fórmulas anteriores numa dosagem suficiente para inibir a angiogénese. Exemplos de compostos específicos que são membros deste género encontram-se listados na Figura 4.

Podem ser utilizados produtos de hidrólise de talidomida de inibição de angiogénese possuindo a seguinte fórmula geral:

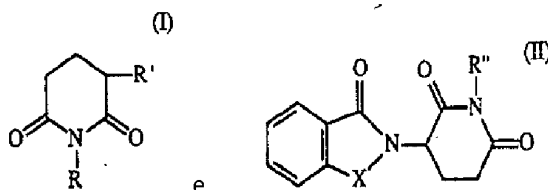


onde X é R_6 conforme foi definido anteriormente, ou

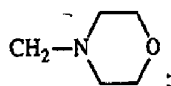


e R_{25} e R_{26} são, independentemente, -OH, -H, ou NH_2 , e $n=1$ a 4. Na Figura 5 são apresentados exemplos desses compostos.

Podem ser utilizados compostos de inibição de angiogénese possuindo a seguinte fórmula geral:

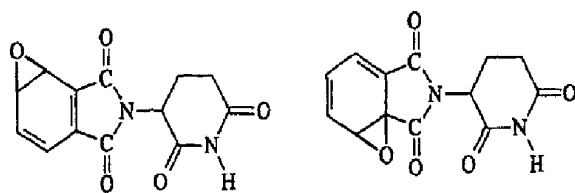


onde R é seleccionado do grupo que consiste em hidrogénio, radicais alquil de 1 a 6 átomos de carbono, o radical fenil, e o radical benzil; onde R' é seleccionado do grupo que consiste no radical ftalimido e no radical succinimido; onde X é CH_2 ou C=O ; e onde R'' é H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{CH=CH}_2$, ou

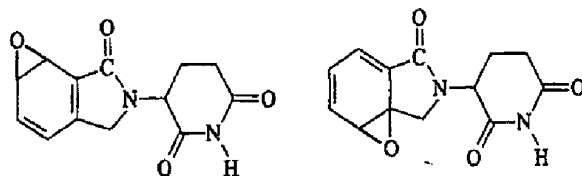


e produtos de hidrólise dos compostos em que R'' é H e o anel piperidino ou os dois anéis piperidino e imido estão hidrolizados.

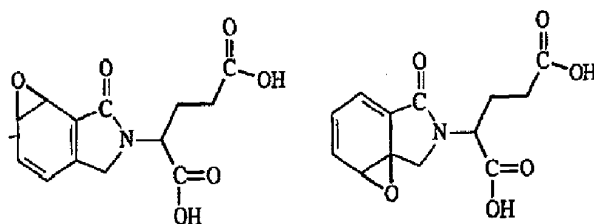
Um outro conjunto de compostos são os epóxidos de talidomida, de EM-12 e de EM-138. Os compostos epóxido representativos apresentam-se da seguinte forma:



Epóxidos de talidomida

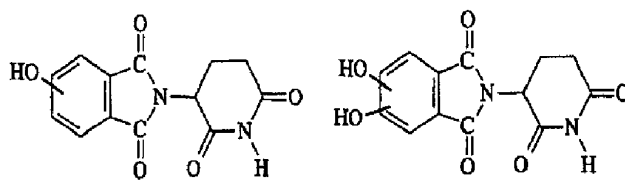


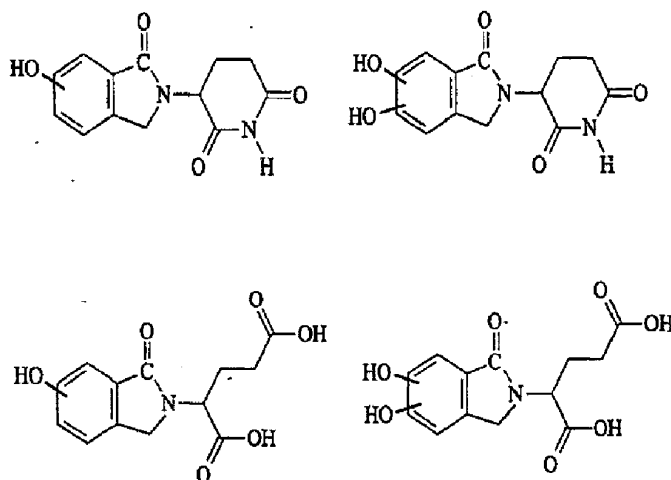
Epóxidos de EM12



Epóxidos de EM 138

Deve entender-se que o epóxido pode estar ligado na posição 6,1 no anel de benzeno, na posição 1,2, na posição 2,3, nas posições 3,4 ou 4,5. Os epóxidos de talidomida, de EM-12, e de EM-138 podem ser hidrolisados resultando nos seguintes compostos:





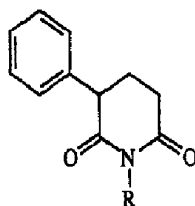
Deve entender-se que o grupo hidroxilo pode encontrar-se nos carbonos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do anel benzeno. Estão também contemplados como parte integrante do presente invento os compostos di-hidroxilo em que os dois grupos hidroxilo se encontram entre si na posição *bis* nos carbonos 1, 2, 3, 5 e 6 dos compostos anteriores. Os epóxidos, os produtos de hidrólise dos epóxidos, e os produtos de hidrólise da talidomida são todos encarados como parte integrante do presente invento.

Sabe-se que os epóxidos são hidrolizados por um grupo de enzimas conhecido como epóxido-hidrolases. Existe uma classe de compostos que são inibidores de epóxido-hidrolase. São exemplos desses compostos a valpromida (2-propilpentamida) e o ácido valpróico (ácido 2-propilpentanóico). Porque os epóxidos são importantes inibidores de angiogénese, contemplam-se as composições que compreendem qualquer um dos compostos inibidores de angiogénese aqui citados em combinação com inibidores de epóxido-hidrolase. Os inibidores de epóxido-hidrolase podem ser administrados a um ser humano ou a um animal, em simultâneo ou sequencialmente. O grupo epóxido parece ser um substituinte importante, comum a vários inibidores de angiogénese. A utilização de inibidores de epóxido-hidrolase para potenciar a actividade de qualquer inibidor de angiogénese que contenha um epóxido é considerada parte integrante do presente invento. Por exemplo, os inibidores de epóxido-hidrolase podem ser administrados com os seguintes compostos antiangiogénicos

contendo epóxido: AGM 1470, Eponimicina, metabolitos microbianos de *Scolecobasidium arenarium* designados f/2015, fr/111142 e fr/18487. Ver Oikawa, *Biochem Biophys. Res. Comm*, Vol. 81:1070 (1971) e Otsuka, *J. Microbial. Biotech.*, Vol 1:163 (1991).

Considera-se a utilização dos inibidores de angiogénese contendo epóxido com ou sem inibidores de epóxido-hidrolase como tratamento para doenças mediadas por níveis elevados ou tóxicos de TNF- α . Reconheceu-se que o TNF- α manifesta uma toxicidade dependente da dose. Se estiver presente em níveis baixos durante um longo período de tempo, o TNF- α pode resultar em caquexia. A caquexia é uma perda geral de peso e enfraquecimento que ocorre no decurso de algumas doenças crónicas tais como cancro, infecções oportunistas de SIDA, doenças inflamatórias, doenças parasíticas, tuberculose, e terapia com dose elevada de IL-2. Os inibidores de angiogénese contendo epóxido, com ou sem inibidores de epóxido-hidrolase, são também eficazes no tratamento de doenças tais como choque séptico, leprosia e doença do enxerto contra hospedeiro.

Por exemplo, em conformidade com o presente invento podem ser utilizados outros compostos que causam dismelia, e.g. ácido 4-metilftálico, piridoxina, vasopressina, acetazolamida, ou um composto que possua a seguinte fórmula (onde R=H, -OH, ou -CH₃):



Em conformidade com o invento, podem também ser utilizados outros compostos que sejam teratogéneos, tais como o ácido valpróico (ácido 2-propilpentanóico), retinóides, tais como ácido cis-retinóico, e rifampina.

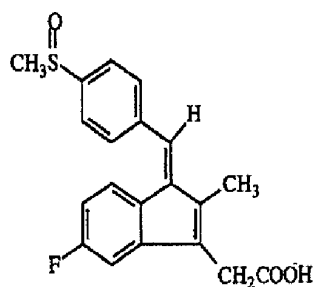
Em resumo, os compostos preferidos são a talidomida assim como os análogos, produtos de hidrólise, metabolitos e precursores de talidomida que sejam teratogénicos, e, mais

especificamente, que causem dismelia. No entanto, deve entender-se que não é necessário que um composto tenha actividade teratogénica e actividade inibidora de angiogénese para ser considerado como parte integrante do presente invento. Os compostos que causam dismelia podem ser identificados através dos procedimentos gerais de Helm, *Arzneimittelforschung*, 31(i/6):941-949 (1981), nos quais se examinam crias de coelho após a exposição ao composto no útero. Os compostos podem geralmente ser adquiridos à e.g. *Andrulis Pharmaceuticals*, Beltsville, MD, ou sintetizados em conformidade com procedimentos conhecidos. Deve entender-se que os compostos podem existir na forma de enantiómeros e que a mistura racémica de enantiómeros ou os enantiómeros isolados são todos considerados no âmbito do presente invento. Muitos dos compostos considerados podem ser enriquecidos em enantiómeros opticamente activos dos compostos anteriormente especificados. Mais especificamente, *Blaschke* referiu que o enantiómero S pode ser desproporcionalmente responsável pelo efeito produtor de dismelia desses compostos. Ver, geralmente *Blaschke*, *Arzneimittelforschung* 29:1640-1642 (1979). Os artigos anteriormente descritos descrevem em geral procedimentos para obter preparações opticamente activas dos compostos de interesse. Ver e.g. *Shealy et al.*, *Chem. Indus.* 1030 (1965); e *Casini et al.*, *Farmaco Ed. Sci.* 19:563 (1964).

Apresenta-se também a inibição de angiogénese e o tratamento de doenças dependentes de angiogénese através da administração de compostos anti-inflamatórios, sozinhos ou em combinação com outros compostos inibidores de angiogénese, tais como os descritos anteriormente. Esses compostos anti-inflamatórios podem ser esteróides ou fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAID). Exemplos de esteróides que podem ser utilizados no invento incluem, embora não se limitem a esses, cortisona, cortisol, corticosterona, hidrocortisona, hidrocortisol, prednisona, prednisolona, dexametasona, beclometasona, betametasona, mometasona, furoato de mometasona, budesonida, triancinolona, acetonido, e fluticasona. Os esteróides preferidos são prednisona, hidrocortisona, cortisol, dexametasona, betametasona, e beclometasona. Os esteróides especialmente preferidos são a hidrocortisona, a dexametasona e a betametasona.

Exemplos de NSAID que podem ser utilizados incluem, embora não se limitem a esses, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, esculetina, fenidona, quercetina, cetoprofeno, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), sulindac, sulindac sulfona, sulfureto de sulindac, indometacina, NS-398 (um inibidor de ciclooxigenase-2), inibidores de ciclooxigenase-1, metil-heptil-imidazole, furegrelato de sódio, SKF525AHCL, inibidores de tromboxano, toradol, ecasa, salsalato, diflunisal, ácido mefenâmico, naproxeno, naproxeno sódico, floctafenina, meclofenamato, fenilbutazona, oxifenbutazona, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, ácido flufenâmico, flurbiprofeno, piroprofeno, tolmetina, apazona, fenbufeno, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, salicilato, e tenoxicam. Os NSAID preferidos são sulindac, sulindac sulfona, sulfureto de sulindac, indometacina, NS-398, metil-heptil-imidazole, furegrelato sódico, e SKF525AHCL. Os NSAID especialmente preferidos são indometacina e sulindac.

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



Esses compostos podem ser utilizados para tratar doenças dependentes de angiogénese. Esses compostos podem ser utilizados individualmente ou combinados com outros compostos inibidores de angiogénese para tratar doenças dependentes de angiogénese, tais como o cancro.

Os compostos descritos anteriormente podem ser proporcionados na forma de formulações farmacêuticamente aceitáveis usando métodos de formulação conhecidos pelos entendidos na matéria. Essas formulações podem ser

administradas pelas vias padrão. Em geral, as combinações podem ser administradas por via tópica, transdérmica, oral, rectal ou parentérica (e.g., intravenosa, subcutânea ou intramuscular). Em adição, as combinações podem ser incorporadas em polímeros biodegradáveis permitindo a libertação sustentada do composto, sendo os polímeros implantados na vizinhança do local onde se deseja a entrega da droga, por exemplo, no local do tumor. Os polímeros biodegradáveis e a sua utilização encontram-se descritos, por exemplo, em detalhe em Brem et al., J. Neurosurg. 74:441-446 (1991).

A dosagem do composto dependerá do problema a tratar, do composto em particular, e de outros factores clínicos tais como o peso e a condição do ser humano ou animal e a via de administração do composto. Deve entender-se que o presente invento tem aplicação em uso humano e veterinário. Para administração oral a seres humanos, é geralmente suficiente uma dosagem entre aproximadamente 0,1 e 300 mg/kg/dia, de preferência entre aproximadamente 0,5 e 50 mg/kg/dia, e de maior preferência entre aproximadamente 1 e 10 mg/kg/dia.

As formulações incluem os adequados para administração oral, rectal, oftálmica (incluindo intravítrea ou intracameral), nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratraqueal, e epidural). As formulações podem ser apresentadas convenientemente numa forma de dosagem unitária e podem ser preparadas através de técnicas farmacêuticas convencionais. Essas técnicas incluem o passo de promover a associação do componente activo e o(s) transportador(es) ou excipiente(s) farmacêuticos. Em geral, as formulações são preparadas promovendo a associação uniforme e íntima do componente activo com transportadores líquidos ou transportadores sólidos finamente divididos ou ambos, e depois, se necessário, dando forma ao produto.

As formulações do presente invento adequadas a administração oral podem ser apresentadas na forma de unidades discretas tais como cápsulas, hóstecas ou comprimidos, contendo cada uma uma quantidade predeterminada do componente activo; na forma de pós ou grânulos; na forma

de uma solução ou de uma suspensão num líquido aquoso ou num líquido não aquoso; ou na forma de uma emulsão líquida de óleo em água ou uma emulsão de água em óleo e na forma de um bolus, etc.

Um comprimido pode ser produzido por compressão ou por moldagem, opcionalmente com um ou mais componentes auxiliares. Os comprimidos obtidos por compressão podem ser preparados comprimindo, numa máquina adequada, o componente activo numa forma fluida tal como um pó ou granulado, misturado opcionalmente com um agente aglutinante, lubrificante, diluente inerte, conservante, tensioactivo ou dispersante. Os comprimidos obtidos por moldagem podem ser produzidos moldando, numa máquina adequada, uma mistura do composto pulverizado molhado com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem opcionalmente ser revestidos ou ranhurados e podem ser formulados de modo a proporcionarem uma libertação lenta ou controlada do componente activo neles contido.

As formulações adequadas para administração tópica na boca incluem rebuçados contendo os componentes numa base aromatizada, usualmente de sucrose e goma arábica ou goma adragante; pastilhas compreendendo o componente activo numa base inerte tal como a gelatina e a glicerina, ou sucrose e goma arábica; e elixires orais compreendendo o componente a administrar num transportador líquido adequado.

As formulações adequadas para administração tópica na pele podem ser apresentadas na forma de pomadas, cremes, géis e pastas compreendendo o componente a administrar num transportador farmacêutico adequado. Um sistema de entrega tópica preferido é um penso transdérmico contendo o componente a administrar.

As formulações para administração rectal podem ser apresentadas na forma de supositório com uma base adequada compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau ou um salicilato.

As formulações adequadas para administração nasal, onde o transportador é um sólido, incluem um pó grosseiro possuindo

um tamanho de partícula, por exemplo, no intervalo de 20 a 500 micrometros que é administrado do mesmo modo que se administra o rapé, *i.e.*, por inalação rápida através da passagem nasal a partir da embalagem do pó que se mantém junto ao nariz. As formulações adequadas, onde o transportador é um líquido, para administração, como por exemplo, um pulverizador nasal ou gotas nasais, incluem soluções aquosas ou oleosas do componente activas.

As formulações adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas na forma de pessários, tampões, cremes, géis, pomadas, espumas ou formulações de aerossóis contendo em adição ao componente activo os transportadores que na especialidade se sabe serem adequados.

As formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções aquosas e não aquosas estéreis injectáveis que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do receptor pretendido; e suspensões aquosas e não aquosas estéreis que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas em embalagens de dose unitária ou multidose, por exemplo ampolas e frasquinhos selados, e podem ser guardados em condições de secagem por congelação (liofilizado) requerendo apenas a adição do transportador líquido estéril, por exemplo, água para injeções, imediatamente antes da utilização. Podem ser preparadas soluções e suspensões injectáveis extemporaneas a partir de pós, grânulos e comprimidos estéreis do tipo anteriormente descrito.

As formulações de dosagem unitária preferidas são as que contêm uma dose ou unidade diária, uma subdose diária, conforme foi aqui anteriormente referido, ou uma sua fracção adequada, do componente administrado.

Deve entender-se que em adição aos componentes, antes particularmente mencionados, as formulações do presente invento podem incluir outros agentes convencionais na especialidade tendo em conta o tipo de formulação em questão, por exemplo, os adequados para administração oral podem incluir agentes aromatizantes.

As doenças associadas a neovascularização da córnea que podem ser tratadas incluem, embora não se limitem a essas, a retinopatia diabética, a retinopatia de prematuridade, rejeição de enxerto córneo, glaucoma neovascular e fibroplasia retrolental, ceratoconjuntivite epidémica, deficiência em vitamina A, uso excessivo de lentes de contacto, ceratite atópica, ceratite límbica superior, ceratite secca de pterígio, síndrome de Sjogren, acne rosácea, filectenulose, sífilis, infecções por micobactérias, degeneração de lípidos, queimaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecções por *Herpes simplex*, infecções por *Herpes zoster*, infecções por protozoários, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneração marginal de Terrien, ceratólise marginal, trauma, artrite reumatóide, lúpus sistémico, poliarterite, sarcoidose de Wegener, esclerite, doença de Stevens-Johnson, ceratotomia radial, rejeição de enxerto córneo e penfigóide.

As doenças associadas a neovascularização retinal/coroidal que podem ser tratadas incluem, embora não se limitem a essas, retinopatia diabética, degeneração macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, doença de Paget, oclusão de veias, oclusão de artérias, doença obstrutiva da carótida, uveíte/vitrite crónica, infecções por micobactérias, doença de Lyme, lúpus eritematoso sistémico, retinopatia de prematuridade, doença de Eale, doença de Behcet, infecções que causam uma retinite ou coroidite, histoplasiose ocular presumida, doença de Best, miopia, fossetas ópticas, doença de Stargardt, pars planite, descolamento crónico da retina, síndromes de hiperviscosidade, toxoplasmose, trauma e complicações após laser. Outras doenças incluem, embora não se limitem a essas, doenças associadas a rubeose (neovascularização do ângulo) e doenças causadas por proliferação anormal de tecido fibrovascular ou fibroso incluindo todas as formas de vitreoretinopatias proliferativas, quer estejam ou não associadas a diabetes.

As doenças associadas a inflamação crónica podem ser tratadas pelas composições e métodos descritos. As doenças com sintomas de inflamação crónica incluem doenças

inflamatórias intestinais tais como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, psoríase, sarcoidose e artrite reumatóide. A angiogénese é um elemento crucial que essas doenças inflamatórias crónicas têm em comum. A inflamação crónica depende da formação contínua de brotos capilares para manter um afluxo de células inflamatórias. O afluxo e a presença das células inflamatórias produzem granulomas e, deste modo, mantêm o estado inflamatório crónico. A inibição da angiogénese pelas composições e pelos métodos do presente invento prevenirá a formação dos granulomas e aliviará a doença.

As composições e os métodos do presente invento podem ser usados para tratar pacientes com doenças intestinais inflamatórias tais como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Tanto a doença de Crohn como a colite ulcerativa caracterizam-se por inflamação crónica e angiogénese em vários locais do tracto intestinal. A doença de Crohn caracteriza-se por inflamação granulomatosa crónica ao longo do tracto gastrointestinal que consiste em novos brotos capilares rodeados por um cilindro de células inflamatórias. A prevenção de angiogénese pelas composições e pelos métodos do presente invento inibe a formação dos brotos e previne a formação de granulomas.

A doença de Crohn ocorre como uma doença inflamatória transmural crónica que afecta mais vulgarmente o íleo distal e o cólon mas pode também ocorrer em qualquer parte do tracto gastrointestinal desde a boca até ao ânus e área perianal. Os pacientes com doença de Crohn possuem geralmente diarreia crónica associada a dor abdominal, febre, anorexia, perda de peso e inchaço abdominal. A colite ulcerativa é também uma doença crónica, não específica, inflamatória e ulcerativa, que surge na mucosa do cólon e se caracteriza pela presença de diarreia sangrenta.

As doenças intestinais inflamatórias também apresentam manifestações extra-intestinais tais como lesões cutâneas. Essas lesões caracterizam-se por inflamação e angiogénese e podem ocorrer em muitos outros locais que não o trato gastrointestinal. As composições e os métodos do presente invento conseguem também tratar essas lesões prevenindo a

angiogénese, reduzindo, dessa forma, o afluxo de células inflamatórias e a formação de lesões.

A sarcoidose é uma outra doença inflamatória crónica que se caracteriza por um distúrbio granulomatoso multi-sistémico. Os granulomas desta doença podem formar-se em qualquer parte do corpo e, assim, os sintomas dependem do local dos granulomas e se a doença está activa. Os granulomas são formados pelos brotos capilares angiogénicos proporcionando um constante fornecimento de células inflamatórias.

As composições e os métodos descritos podem também tratar problemas inflamatórios crónicos associados a psoríase. A psoríase, uma doença de pele, é uma outra doença crónica e recorrente que se caracteriza por pápulas e placas de vários tamanhos. A prevenção da formação de novos vasos sanguíneos necessários para manter as lesões características conduzem a um alívio dos sintomas.

Uma outra doença que pode ser tratada é a artrite reumatóide. A artrite reumatóide é uma doença crónica inflamatória que se caracteriza por inflamação não específica das articulações periféricas. Acredita-se que os vasos sanguíneos no revestimento sinovial das articulações sofrem angiogénese. Em adição à formação de novas redes vasculares, as células endoteliais libertam factores e espécies reactivas de oxigénio que conduzem ao crescimento de *pannus* e à destruição da cartilagem. Os factores envolvidos em angiogénese podem contribuir activamente para o estado cronicamente inflamado da artrite reumatóide e podem ajudar a mantê-lo.

Outras doenças que podem ser tratadas são os hemangiomas, a doença de Osler-Weber-Rendu, ou a telangiectasia hemorrágica hereditária, tumores sólidos ou originários no sangue e síndrome de imunodeficiência adquirida.

As composições e os métodos do presente invento incluem a utilização de compostos inibidores de angiogénese e compostos anti-inflamatórios, tais como esteróides ou fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAID).

As composições e os métodos do presente invento incluem a combinação de compostos inibidores de angiogénese, tais como a talidomida ou análogos semelhantes a talidomida ou AMG-1470, EM-12 ou EM-138, com compostos anti-inflamatórios, tais como os esteróides ou os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAID). As composições e os métodos do presente invento também incluem a utilização só de compostos anti-inflamatórios. Essas composições podem ser utilizadas para tratar doenças dependentes de angiogénese.

Por exemplo, verificou-se que a indometacina (5 mg/kg) inibe a angiogénese induzida por bFGF em 59% e a angiogénese induzida por VEGF em 61%. Verificou-se, igualmente, que o sulindac (25 mg/kg) inibe a angiogénese induzida por bFGF em 50% e a angiogénese induzida por VEGF em 55%. O sulindac é metabolizado *in vivo* resultando em dois metabolitos: sulfureto de sulindac e sulindac sulfona. O sulfureto de sulindac inibe activamente a síntese de prostaglandina, enquanto que a sulindac sulfona não; no entanto, verificou-se que ambos são inibidores de angiogénese. Verificou-se que o sulfureto de sulindac inibe a neovascularização induzida por bFGF em 34%, e que a sulindac sulfona exibiu 31% de inibição.

Verificou-se que outros NSAID inibem a angiogénese associada a neovascularização. Por exemplo, o carbometilheptil-imidazole e o furegrelato sódico, ambos inibidores de tromboxano, inibem a neovascularização induzida por bFGF em 32% e 22%, respectivamente. Verificou-se que um outro inibidor de tromboxano, o SKF525AHCL, que promove a produção de prostaglandina, inibe a neovascularização induzida por bFGF em 25%. O inibidor de ciclooxigenase-2 específico NS-398 também inibiu a neovascularização induzida por bFGF em 25%.

Quando o sulindac é combinado com a talidomida, existe um efeito aditivo na inibição de angiogénese. Quando o sulindac é combinado com outros compostos inibidores de angiogénese, tais como o AMG 1470, o EM-12 ou o EM-138, existe um efeito aditivo sobre a inibição de angiogénese. A angiogénese no olho, num teste descrito no Exemplo 2, é produzida pela presença de bFGF (factor de crescimento fibroblástico

básico) e de VEGF (factor de crescimento de células endoteliais vasculares). Observou-se a inibição dessa angiogénese com os NSAID, os esteróides, a talidomida, ou a combinação de talidomida e de NSAID, sulindac.

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

A inibição de VEGF em 74% demonstra o efeito aditivo quando se combina talidomida e sulindac. Os dados para a hidrocortisona, o sulindac, a talidomida e talidomida + sulindac diferem significativamente dos controlos ($p < 0,0001$). Os estudos com a composição compreendendo talidomida e sulindac sobre carcinoma V2 em coelhos demonstraram uma T/C (razão entre Tratado e Controlo) de 0,32 após 18 dias de tratamento oral com 200 mg/kg de talidomida combinados com 25 mg/kg de sulindac.

Observa-se também um efeito aditivo na combinação de fármacos anti-inflamatórios não esteróides e outros compostos inibidores de angiogénese tal como a combinação de sulindac e AMG-1470. O AGM-1470 é um composto inibidor de angiogénese conhecido, segundo foi apresentado em Brem et al., *Minimal drug resistance occurs after prolonged antiangiogenic therapy with AGM-1470*, *Surgical Forum* 45 (0), 1994, pág. 674-677. Conforme se pode observar no quadro anterior, o sulindac mais AGM-1470 apresenta um maior efeito inibidor na angiogénese do que cada um dos compostos isolados.

Exemplo I

Utiliza-se o teste com membrana corioalantóica de embrião de pinto descrito por Crum *et al.*, Science 230:1375 *et seq.* (1985), para identificar compostos que não requerem mais conversão metabólica. Ver também, Patente dos Estados Unidos da América 5001116, que descreve o teste de CAM no col. 7 do paciente. De modo sumário, no dia 3 ou 4 removeram-se das suas cascas embriões de pintos fertilizados, e implantou-se na membrana corioalantóica um disco de metilcelulose contendo o composto. Examinaram-se os embriões 48 horas mais tarde e, se aparecesse uma zona clara avascular à volta do disco de metilcelulose, media-se o diâmetro dessa zona.

Exemplo II

Teste de angiogénese em córnea de coelho

Produziram-se pelotas para implantar em córneas de coelhos, misturando 110 µl de salino contendo 12 µg de bFGF recombinante (*Takeda Pharmaceuticals* - Japão) com 40 mg de sucralfato (*Bukh Meditec* - Dinamarca); adicionou-se esta suspensão a 80 µl de hidrogenião a 12% (*Interferon Sciences*) em etanol. Pipetaram-se quantidades alíquotas de 10 µl desta mistura para cavilhas de Teflon e deixou-se secar produzindo aproximadamente 17 pelotas. Implantou-se uma pelota nas microbolsas córneas de cada olho de uma coelha branca da Nova Zelândia anestesiada, a 2 mm do limbo seguido de aplicação tópica de pomada de eritromicina na superfície da córnea. Alimentaram-se os animais diariamente a partir de 2 dias após a implantação por lavagem gástrica com droga em suspensão em carboximetilcelulose a 0,5% ou com carboximetilcelulose a 0,5% sozinha. Adquiriu-se talidomida à *Andrulus Pharmaceutical (Maryland)* e a *Grunenthal GMBH (Alemanha)* cedeu gentilmente o EM-12 e a supidimida. Examinaram-se os animais com uma lâmpada de fenda todos os outros dias numa maneira dissimulada pelo mesmo especialista em córneas. Determinou-se a área de neovascularização da córnea medindo com um retículo o comprimento do vaso (L) desde o limbo e o número de horas relógio (C) de limbo envolvido. Utilizou-se uma fórmula para determinar a área de um segmento de banda circular: $C/12 \times 3,1416 [r^2 - (r-L)^2]$ onde $r=6$ mm o raio medido da córnea de coelho. Utilizaram-se

vários modelos matemáticos para determinar a quantidade de córnea vascularizada, e verificou-se que esta fórmula proporcionou a aproximação mais precisa da área da banda de neovascularização que cresce na direcção da pelota.

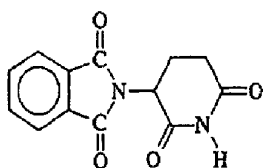
É importante salientar que o teste de córnea de coelho é preferido porque de modo geral reconhecerá compostos que são per se inactivos mas são metabolizados para produzirem compostos activos. Sabe-se que os compostos relacionados com talidomida, como se apresentam mais tarde no Exemplo III, são teratogénicos e são candidatos a utilização no presente invento.

Exemplo III

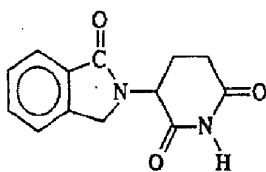
Inibição de neovascularização da córnea induzida por bFGF pela talidomida e por análogos relacionados, expressa como percentagem de controlo mediano no dia 8

Implantaram-se pelotas contendo bFGF e sucralfato em microbolsas das duas córneas de coelhos em conformidade com o Exemplo II. Notou-se, pela primeira vez, o crescimento de vasos na córnea límpida a partir do limbo no dia 2 e começaram-se os tratamentos nesse dia (200 mg/kg oralmente). Mediu-se a área de neovascularização da córnea desde o dia 4 até ao dia 12. Utilizaram-se as medições do dia 8 para comparação entre grupos. Neste ponto temporal não se observou qualquer regressão de vasos e verificou-se neovascularização próxima do máximo. Efectuou-se a análise estatística com ANOVA com dados ordenados para contabilizar a variação interexperimental e proteger contra uma distribuição de dados não normal (*i.e. outliers*) utilizando um método não paramétrico.

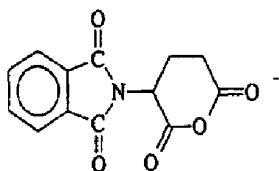
Os compostos testados foram os seguintes:



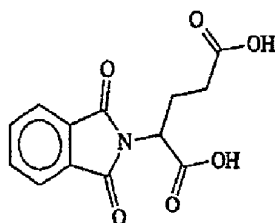
Talidomida



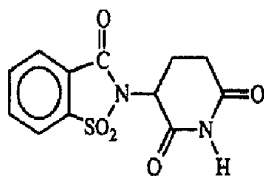
EM-12



Anidrido ftaloilglutâmico (PGA)



Ácido ftaloilglutâmico (Ácido PG)



Suprimida

O tratamento com uma dose de (200 mg/kg) de talidomida resultou numa inibição da área de córnea vascularizada que variou de 30-51% em três ensaios com uma inibição mediana de 36% (Figura 6) (n=30 olhos, $p=0,0001$, ANOVA *two-way* (a dois factores) com dados ordenados). Observou-se a inibição de angiogénese pela talidomida após apenas duas doses (Figura 7). Os coelhos não demonstraram sedação óbvia e não existiram quaisquer sinais de toxicidade ou perda de peso. O análogo teratogénico EM-12, que partilha as outras propriedades da talidomida, foi também inibidor, com uma inibição mediana de 42% (n=10 olhos, $p=0,002$, ANOVA *one-way* (a um factor) com dados ordenados). A supidimida, um análogo

não teratogénico da talidomida que mantém as propriedades sedativas da talidomida, não exibiu qualquer actividade (área 107% de controlo, n=10 olhos, não estatisticamente diferente do controlo). Outros análogos, PGA e ácido PG apresentaram efeitos inibidores mais fracos do que a talidomida (dados não apresentados). A densidade do crescimento de vasos em animais tratados com talidomida foi também reduzida, acentuadamente.

Exemplo IV

EM-12 em teste de córnea de coelho

Testou-se EM-12 no teste de córnea de coelho descrito no Exemplo II a 100 mg/ kg/ dia e mostrou 21% de inibição, e a 200 mg/ kg/ dia o teste mostrou 43% de inibição.

Exemplo V

Ácido ftaloilglutâmico em CAM

Testou-se ácido ftaloilglutâmico no teste de CAM descrito anteriormente e exibiu uma zona avascular com uma leve cicatriz.

Exemplo VI

Ácido ftaloilglutâmico em teste de córnea de coelho

Ácido ftaloilglutâmico descrito anteriormente a 200 mg/kg e exibiu 29% de inibição de angiogénese.

Exemplo VII

Anidrido ftaloilglutâmico em teste de CAM

Testou-se anidrido ftaloilglutâmico no teste de CAM descrito anteriormente e exibiu uma zona avascular.

Exemplo VIII

Tratamento de Doença de Crohn

Tratou-se uma paciente feminina de 32 anos com doença de Crohn usando os métodos do presente invento. A paciente exibia os sintomas característicos da doença de Crohn, *i.e.* grave envolvimento gastrointestinal (incluindo diarreia e

cólicas) e uma grande lesão cutânea na perna. Administrou-se-lhe talidomida, oralmente, a uma dosagem de 100 mg duas vezes por dia. Após a continuação do tratamento durante uma semana, os sintomas gastrointestinais, incluindo a diarreia e as cólicas, reduziram e a lesão cutânea curou-se.

Exemplo IX

Teste de microbolso corneal

Obtiveram-se ratinhos machos C57Bl6 com seis a oito semanas de idade dos *Jackson Laboratories, MA*. Anestesiaram-se os ratinhos e fizeram-se bolsas de 0,4 × 0,4 mm no estroma da córnea do ratinho adjacente ao limbo. Implantaram-se pelotas contendo 80 ng de bFGF ou de VEGF nas pelotas. Implantaram-se as pelotas contendo o bFGF a 1,0-1,2 mm dos vasos límbicos, ao passo que as pelotas contendo o VEGF foram implantadas a 0,5-0,7 mm dos vasos límbicos. Depois aplicou-se topicamente eritromicina.

Trataram-se seguidamente os ratinhos com doses variáveis de fármaco anti-inflamatório, conforme está apresentado no Quadro a baixo. Mediu-se a resposta vascular às pelotas pelo comprimento máximo de vasos e pelo número de horas relógio de neovascularização, 5 dias após a implantação das pelotas de bFGF e 6 dias após a implantação das pelotas de VEGF. Calculou-se a área de neovascularização da córnea usando a seguinte fórmula que melhor se aproximou da área de neovascularização: Área (mm²) = [$\pi \times$ horas relógio \times comprimento (mm) \times 0,2(mm)]. Os resultados encontram-se no quadro a seguir.

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

O efeito inibidor é expresso em percentagem que representa a área de neovascularização da córnea por bFGF ou por VEGF comparada aos controlos (n=8/ ensaio) dos ensaios em que esse determinado fármaco foi testado. N= ao número de olhos testados e os fármacos foram administrados uma vez por dia por via sc, ip ou oral, conforme foi descrito.

Exemplo X

Obtiveram-se ratinhos machos C57Bl6 com seis a oito semanas de idade dos *Jackson Laboratories, MA*. Anestesiaram-se os ratinhos e fizeram-se bolsas de 0,4 × 0,4 mm no estroma da córnea do ratinho adjacente ao limbo. Implantaram-se pelotas contendo 80 ng de bFGF ou de VEGF. Implantaram-se as pelotas contendo o bFGF a 1,0-1,2 mm dos vasos límbicos, ao passo que as pelotas contendo o VEGF foram implantadas a 0,5-0,7 mm dos vasos límbicos. Depois aplicou-se topicamente eritromicina.

Trataram-se seguidamente os ratinhos com talidomida, indometacina, sulindac, ou combinações de talidomida com indometacina ou sulindac. Mediu-se a resposta vascular às pelotas pelo comprimento máximo de vasos e pelo número de horas relógio de neovascularização, 5 dias após a implantação das pelotas de bFGF e 6 dias após a implantação das pelotas de VEGF. Calculou-se a área de neovascularização da córnea usando a seguinte fórmula que melhor se aproximou da área de neovascularização: Área (mm²) = [$\pi \times$ horas relógio \times comprimento (mm) \times 0,2 (mm)]. Os resultados encontram-se no quadro a seguir.

AGENTE	DOSE	bFGF ¹	VEGF ²	n
Talidomida	200 mg/kg	41	40	31/39
Indometacina	5 mg/kg	59	61	15/21
Sulindac	25 mg/kg	50	55	15/15
Talidomida + Indometacina	200 mg/kg + 5 mg/kg	67	61	15/21
Talidomida + Sulindac	200 mg/kg + 25 mg/kg	63 ³	74 ³	15/16
¹ % Inibição de angiogénese induzida por bFGF ² % Inibição de angiogénese induzida por VEGF ³ Efeito inibidor é significativamente diferente de cada um dos agentes quando sozinhos (p < 0,01, testado por ANOVA)				

O efeito inibidor é expresso em percentagem que representa a área de neovascularização da córnea por bFGF ou

por VEGF comparada aos controlos (n=8/ ensaio) dos ensaios em que essa determinada droga foi testada. N= ao número de olhos testados e as drogas foram administradas uma vez por dia por via sc, ip ou oral, conforme foi descrito.

Exemplo XI

Anestesiaram-se ratinhos machos C57B16 com seis a oito semanas de idade obtidos dos *Jackson Laboratories, MA*, e fizeram-se bolsas de 0,4 × 0,4 mm no estroma da córnea do ratinho adjacente ao limbo. Implantaram-se pelotas contendo 80 ng de bFGF a 1,0-1,2 mm dos vasos límbicos. Depois aplicou-se topicamente eritromicina.

Trataram-se seguidamente os ratinhos com sulindac ou com um dos derivados de sulindac, a sulindac sulfona ou o sulfureto de sulindac. Mediu-se a resposta vascular às pelotas pelo comprimento máximo de vasos e pelo número de horas relógio de neovascularização, 5 dias após a implantação das pelotas de bFGF. Calculou-se a área de neovascularização da córnea usando a seguinte fórmula que melhor se aproximou da área de neovascularização: Área (mm²) = [π × horas relógio × comprimento (mm) × 0,2 (mm)]. Os resultados encontram-se no quadro a seguir.

AGENTE	DOSE	% DE INIBIÇÃO	n
Sulindac	25 mg/kg	50	15
Sulfureto de Sulindac	25 mg/kg	31	8
	50 mg/kg	34	8
Sulindac sulfona	25 mg/kg	31	16

O efeito inibidor é expresso em percentagem representando a área de neovascularização da córnea por bFGF comparada aos controlos (n=8/ ensaio). N= ao número de olhos testados e as drogas foram administradas uma vez por dia por via sc, ip ou oral, conforme foi descrito.

Exemplo XII

Teste em tumor

Utilizaram-se coelhas brancas da Nova Zelândia, pesando aproximadamente 1,5 kg, obtidas da *Charles River, MA*, para propagação de V2-carcinoma. Este tumor tem origem em

papiloma induzido pelo vírus Shope. Implantaram-se intramuscularmente pequenos pedaços de 0,5 × 0,5 cm na coxa direita. No dia 10 após a implantação do tumor, quando o volume médio do tumor era 6 cm³, iniciou-se o tratamento com 200 mg/ kg/ dia de talidomida (n = 14), 60 mg/ kg/dia de sulindac (n = 5), ou uma combinação de talidomida e sulindac (n = 10). Trataram-se os animais de controlo (n = 13) com metilcelulose. Sacrificaram-se os ratinhos 17 dias após o início do tratamento, quando o volume médio dos tumores de controlo era 100 cm³. Os resultados desta experiência (Figura 8) mostram que a combinação de talidomida e sulindac é mais eficaz na redução do tamanho de tumores de V2-carcinoma do que a talidomida ou o sulindac sozinhos. A combinação de talidomida e sulindac inibiu o crescimento do tumor em 75% e foi significativamente diferente (p <0,05) quer de agente sozinho, quer do grupo de controlo. O tratamento oral com sulindac ou com talidomida inibiu o crescimento do tumor em, respectivamente, 35% (n = 5, p <0,01) e 55% (n = 14, p <0,01). Recolheram-se os dados em 3 ensaios separados e cada barra representa o erro padrão da média.

Lisboa, 2011-01-20

REIVINDICAÇÕES

1. Talidomida e dexametasona para utilizar no tratamento de um tumor originário no sangue, onde a talidomida e a dexametasona são administradas em simultâneo a um ser humano ou a um animal.

2. Talidomida e dexametasona para utilizar no tratamento de um tumor originário no sangue, onde a talidomida e a dexametasona são administradas sequencialmente a um ser humano ou a um animal.

3. Talidomida e dexametasona para utilizar no tratamento de um tumor sólido, onde a talidomida e a dexametasona são administradas em simultâneo ou sequencialmente a um ser humano ou a um animal.

4. Talidomida e dexametasona de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, onde a quantidade de talidomida é de 0,1 a 300 mg/kg/dia.

5. Talidomida e dexametasona de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, onde a quantidade de talidomida é de 0,5 a 50 mg/kg/dia.

6. Talidomida e dexametasona de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, onde a quantidade de talidomida é de 1 a 10 mg/kg/dia.

7. Talidomida e dexametasona de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, onde a talidomida e a dexametasona se destinam a administração parentérica.

8. Talidomida e dexametasona de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, onde a talidomida e a dexametasona se destinam a administração oral.

Lisboa, 2011-01-20

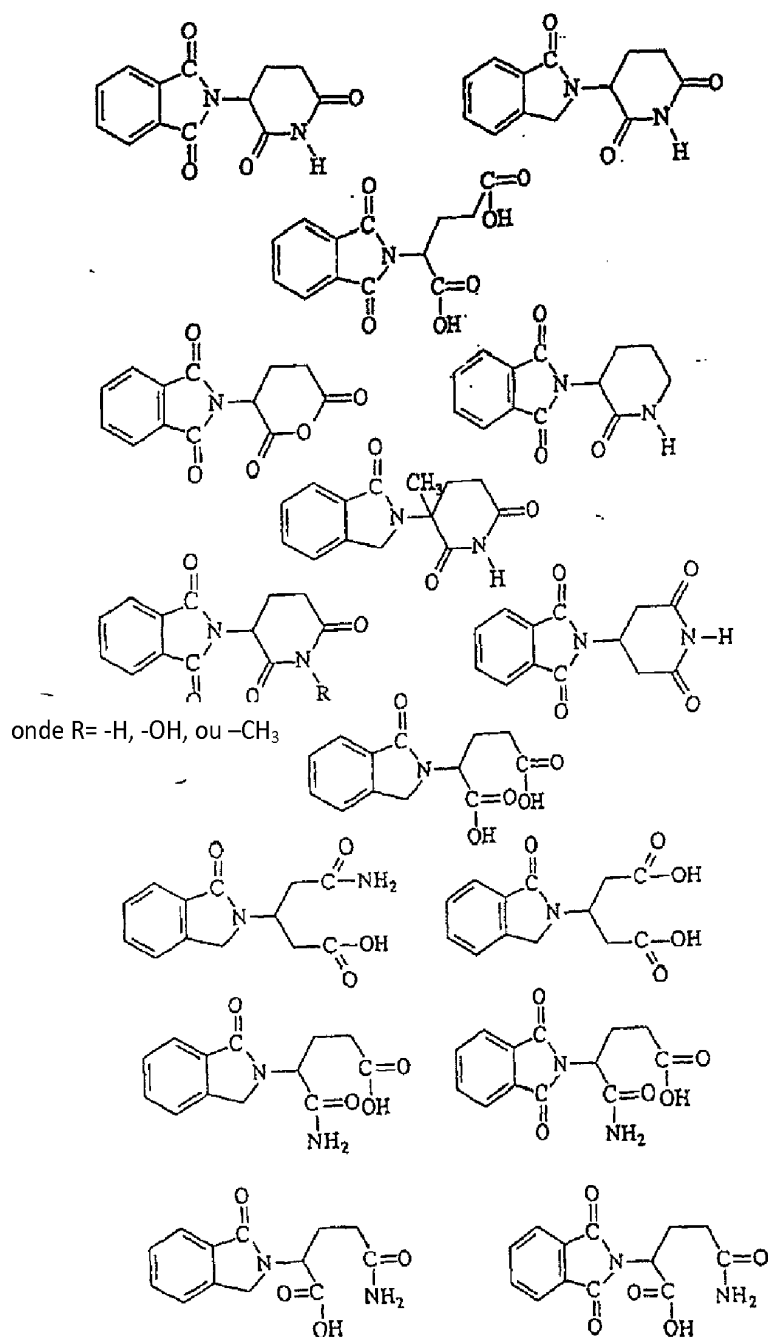


FIGURA 1

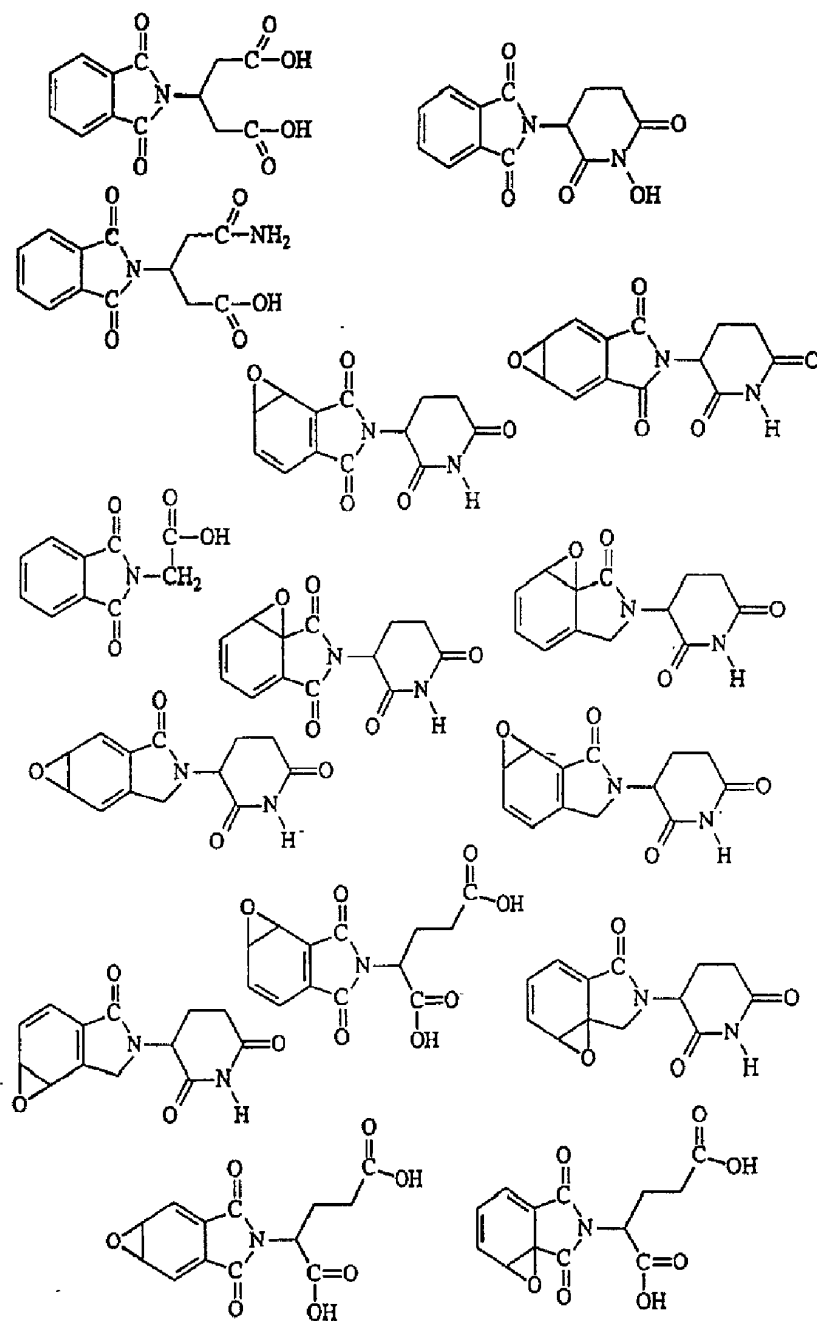


FIGURA 2

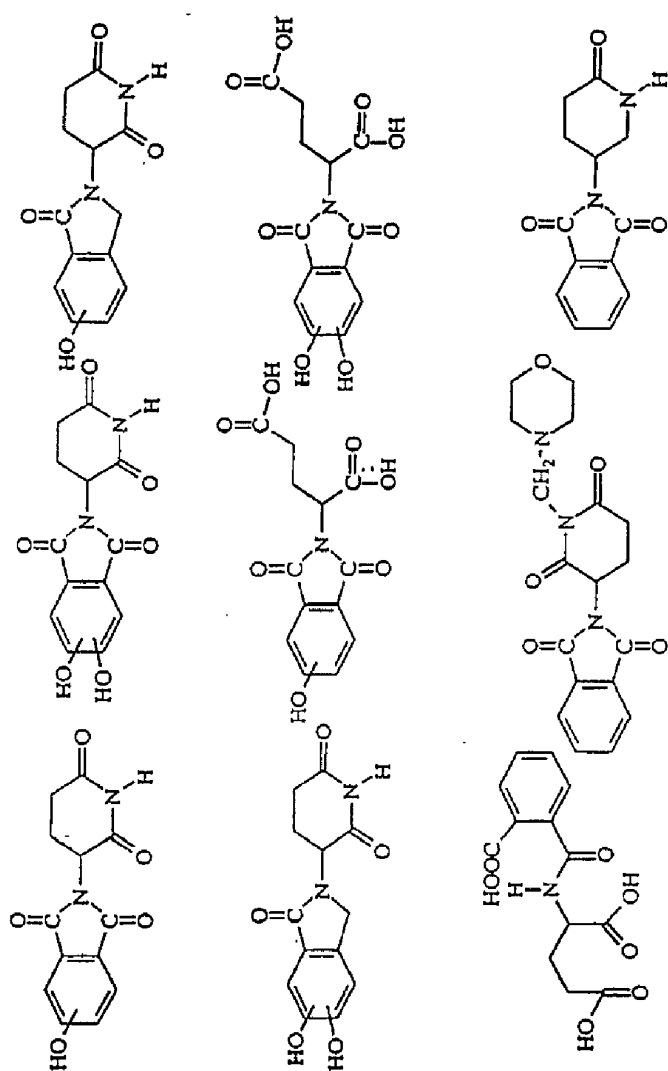


FIGURA 3

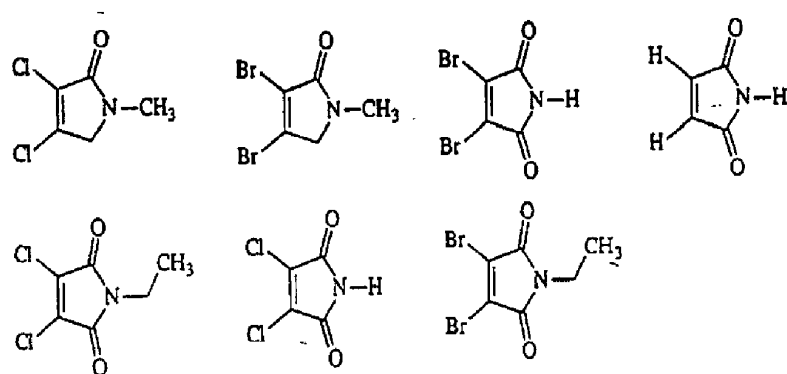


FIGURA 4

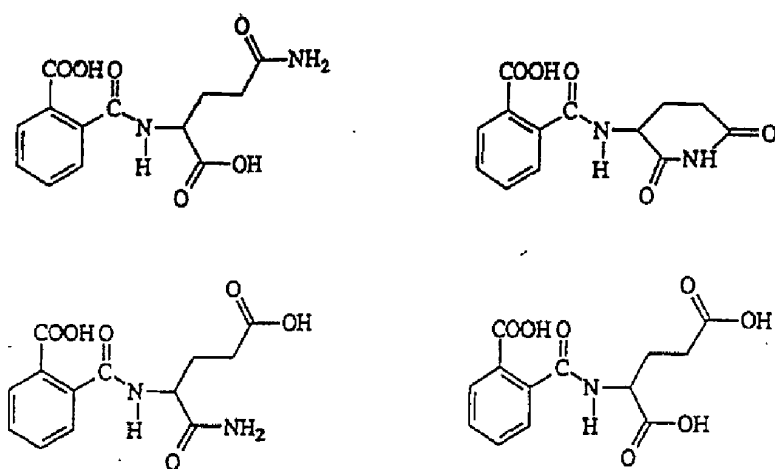


FIGURA 5

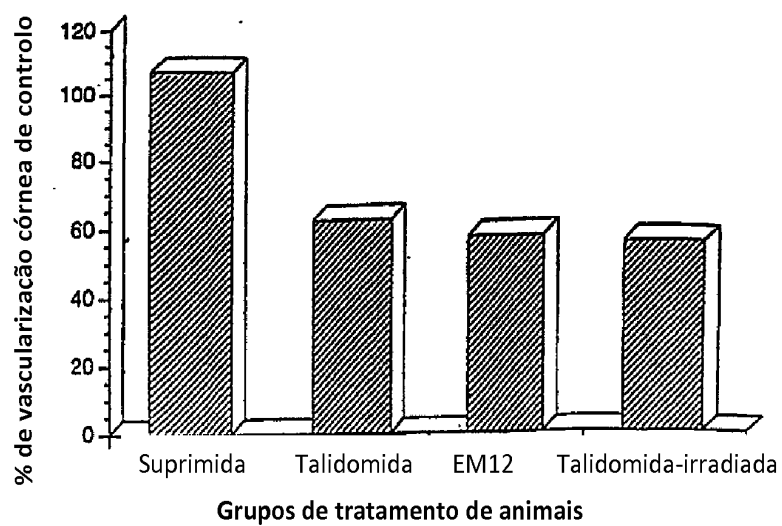


FIGURA 6

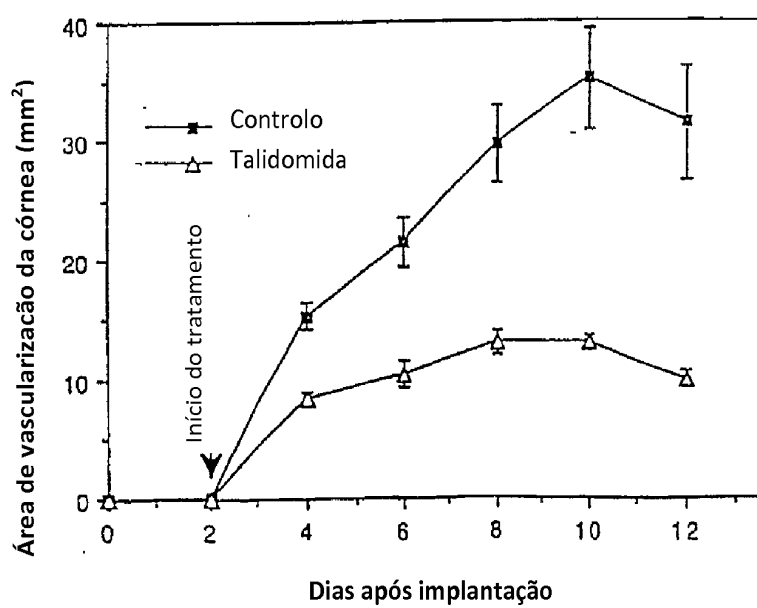


FIGURA 7

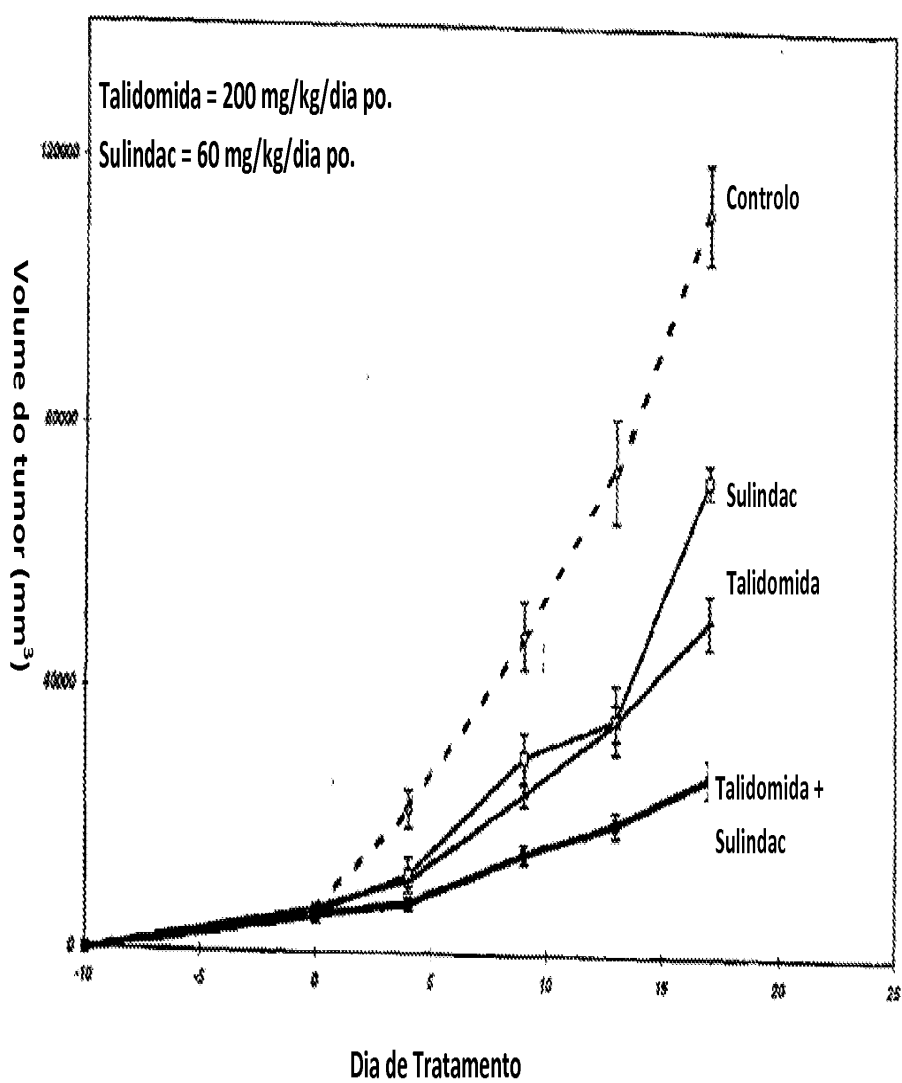


FIGURA 8