

(11) Número de Publicação: **PT 1962822 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/198 (2007.10) **A61P 35/00** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: 2006.11.27	(73) Titular(es): SAMUEL SAMNICK STEINHÜBEL 11 66424 HOMBURG/SAAR DE
(30) Prioridade(s): 2005.11.25 EP 05025776	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.09.03	(72) Inventor(es): SAMUEL SAMNICK DE
(45) Data e BPI da concessão: 2010.01.06 068/2010	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **TERAPIA DE NEOPLASIAS MALIGNAS**

(57) Resumo:

RESUMO

TERAPIA DE NEOPLASIAS MALIGNAS

A presente invenção tem por objecto uma 3-iodo-L-fenilalanina ou uma 4-iodo-L-fenilalanina para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma neoplasia maligna. Além disso, a presente invenção tem por objecto um processo para o tratamento de neoplasias malignas, processo esse que compreende as etapas de administração de 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina a um indivíduo que delas necessite e uma composição farmacêutica que contém 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina.

DESCRIÇÃO

TERAPIA DE NEOPLASIAS MALIGNAS

A presente invenção tem por objecto 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de neoplasias malignas. Além disso, a presente invenção tem por objecto um processo para o tratamento de neoplasias malignas, processo esse que compreende as etapas de administração de 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina a um indivíduo que delas necessite e uma composição farmacêutica que contém 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina.

Ao longo da presente memória descritiva cita-se uma série de documentos. O conteúdo descritivo dos referidos documentos incluindo os manuais dos fabricantes é aqui incorporado na sua totalidade como documentos de referência.

As neoplasias malignas avançadas são caracterizadas por uma doença localmente infiltrante e pela formação de uma ou múltiplas metástases locais ou distantes, microscópicas ou macroscópicas. É conhecido da técnica que essas neoplasias são acompanhadas por um fenómeno concomitante de desenvolvimento de resistência a regimes convencionais de quimioterapia. Exemplos são os gliomas malignos recorrentes, o cancro avançado da mama, o cancro avançado do ovário, o cancro avançado da próstata, o melanoma maligno avançado ou um mieloma múltiplo. Estas neoplasias não são normalmente tratáveis por meio dos tratamentos curativos locais, tais como, por exemplo, cirurgia ou terapia de radiação local mas, em vez disso, requerem a administração sistémica de agentes terapêuticos e de regimes quimioterapêuticos de aplicação tópica. Mesmo a utilização de agentes quimioterapêuticos,

contendo uma combinação de diferentes agentes de modo a impedir o desenvolvimento da resistência aos produtos químicos até agentes isolados e para otimizar a tolerância de regimes normalmente altamente tóxicos para os pacientes falha num número significativo de casos.

Os regimes quimioterapêuticos de primeira linha estabelecidos para neoplasias avançadas induzem, nalgumas entidades tumorais, taxas de remissão completa até 10 - 20 % [1-2]. Pelo contrário, as taxas de resposta de doenças que recorrentemente se repetem são muito mais baixas devido ao desenvolvimento de quimioresistência indutível ou à selecção de mutantes quimio-resistentes. Outros tumores, tais como, gliomas malignos são resistentes de uma forma primária à maior parte dos agentes quimioterapêuticos devido quer à farmacocinética (por exemplo, à falta de penetração na barreira cerebral do sangue) ou à quimioresistência intrínseca. Uma quimio-sensibilidade diminuída pode ser mediada por mecanismos de desintoxicação celular induzidos, tais como, os produtos dos genes PgP, MDR e outros.

Os regimes de quimioterapia utilizados para tratar estádios avançados de cancro incluem agentes de alquilação de segunda linha, tal como, melfalano, compostos contendo platina, inibidores de topoisomerase ou antimetabolitos, estão associados a efeitos extremamente tóxicos na medula óssea e noutros órgãos, limitando a administração terapêutica ou paliativa [3-5].

Sabe-se que a maior parte dos tumores partilham a capacidade de acumular aminoácidos de uma forma mais eficaz do que os tecidos normais e os tecidos não tumorais com patologias, tal como, por exemplo, as doenças inflamatórias. Por isso, tem-se utilizado aminoácidos marcados com rádio

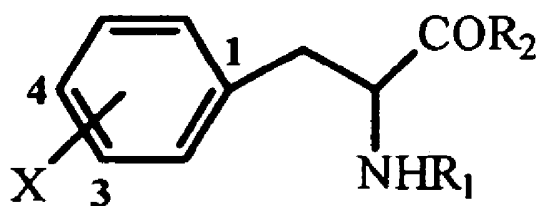
para obter imagens clínicas de tumores, utilizando técnicas de medicina nuclear, tal como, a tomografia de emissão de positrões e a tomografia computadorizada simples de emissão de fótons [6]. A 4-iodo-L-fenilalanina (IFA, IPA na terminologia inglesa) é um aminoácido iodado de ocorrência natural, que exibe uma elevada afinidade para tumores humanos. A sua marcada acumulação nos tumores está associada principalmente a um transporte aumentado dos aminoácidos para as células neoplásicas, o que já foi demonstrando como sendo específico para muitos tumores [7]. A avaliação clínica inicial com o análogo 4-¹²³I]iodo-L-fenilalanina (IFA-123) marcado com iodo-123 demonstrou a eficácia e a segurança da tomografia simples de emissão de fótons (TSEF, SPET na terminologia inglesa) com IFA-123 para obter imagens de tumores do cérebro [8, 9]. A IFA-123 atravessa, de acordo com [8, 9] a barreira cerebral do sangue após administração intravenosa e acumula-se especificamente em gliomas malignos sem uma retenção prolongada no tumor.

Já se fizeram ensaios de uma série de derivados de aminoácidos para avaliar as suas actividades anti-neoplásicas em rastreios anti-tumor [10-15]. Incluem as halobenzoil-DL-fenilalaninas, derivados de N-cloroacetilo de fenilalaninas substituídas na posição para, N-benzoilfluorofenilalanina, p-cloro-DL-fenilalanina, α -metil-fenilalanina, N-etilcarbaminometil-L-isoleucina e N-propionil-L-valina, para mencionar apenas alguns. Contudo, a administração de todos os compostos do referido grupo é também conhecida por estar associada com efeitos secundários extremamente tóxicos na medula óssea e noutros órgãos, limitando a administração terapêutica ou paliativa. Por exemplo, sabe-se na técnica desde 1974 que a p-clorofenilalanina interfere com o crescimento de ratos em desenvolvimento [16] o que desqualifica esta classe de compostos como um composto potencial para o tratamento de

doenças malignas com um perfil de toxicidade aceitável. Além disso, as doses eficazes dos compostos descritos no documento correspondente são relativamente elevadas. Por exemplo, em [15] descreve-se que uma dose de 2,5 a 10 mmole/L de p-clorofenilalanina (4-cloro-fenilalanina) foi necessária para demonstrar um efeito citotóxico do composto em neuroblastos de murino. Assim, o problema técnico subjacente à presente invenção consiste em providenciar meios e métodos para o tratamento melhor de neoplasias malignas. A solução para este problema técnico é conseguida por meio das formas de realização caracterizadas nas reivindicações.

De acordo com isto, a presente invenção tem por objecto a utilização de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de neoplasias malignas.

A iodo-L-fenilalanina, nas formas aplicáveis de acordo com a presente invenção, é representada pela fórmula geral I:



Fórmula Geral I

em que,

X representa um iodo ligado a L-fenilalanina na posição 3- (meta-) ou na posição 4- (para-) dentro do anel aromático.

R₁ representa H, grupo alquilo, aminoácido, péptido, proteína ou outros resíduos conhecidos por facilitarem ou melhorarem o alcance do tumor.

R₂ representa OH, aminoácido ou outros resíduos conhecidos por facilitarem ou melhorarem o alcance do tumor.

A 3-iodo-L-fenilalanina pode também ser designada por meta-iodo-L-fenilalanina (IMA) e a 4-iodo-L-fenilalanina como para-iodo-L-fenilalanina (IFA). É preferível que R₁ represente H e R₂ represente OH. Contudo, é mais preferível que o iodo conjugado com a L-fenilalanina seja estável, um isótopo de [¹²⁷I]-iodo não radioactivo. A expressão "neoplasia maligna" descreve, no contexto da presente invenção, um cancro, um carcinoma, um sarcoma ou outro tumor, caracterizados por um crescimento progressivo, descontrolado, invasivo e/ou metástico. Uma neoplasia maligna conduz invariavelmente à morte se não for tratada. Uma indicação para uma administração de uma composição farmacêutica que contenha 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, a um indivíduo com neoplasia maligna, é também o diagnóstico da doença residual mínima, preferencialmente, num tumor sólido num estado inicial, num tumor sólido avançado ou num tumor sólido com metástases, que é caracterizado pela recorrência local e não local do tumor causada pela sobrevivência de células únicas. De acordo com a presente invenção, a expressão "composição farmacêutica" diz respeito a uma composição para administração a um indivíduo, preferencialmente a um paciente humano. A composição farmacêutica é administrada preferencialmente oralmente, parentericamente, transdermicamente, intraluminalmente, intra-arterialmente, intratecalmente ou intravenosamente. Também são preferíveis as injeções directas da composição farmacêutica no tecido maligno. Considera-se particularmente que a referida composição farmacêutica seja administrada num paciente por

via de infusão ou injeção ou com um comprimido ou uma cápsula. A administração das composições apropriadas pode ser efectuada por diferentes vias, por exemplo, por administração intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, tópica ou intradérmica. A composição farmacêutica pode ainda compreender um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Exemplos de veículos apropriados sobre o ponto de vista farmacêutico são bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, tais como, emulsões de óleo/água, vários tipos de agentes de molhagem, soluções esterilizadas, etc. As composições que compreendem esses veículos podem ser formuladas por processos convencionais bem conhecidos. Essas composições farmacêuticas podem ser administradas ao indivíduo numa dose apropriada. O regime de dosagem será determinado pelo médico assistente e pelos factores clínicos. Tal como é bem conhecido nas técnicas médicas, as dosagens para qualquer paciente dependem de muitos factores, incluindo o tamanho do paciente, a área da superfície do corpo, a idade, o composto particular a ser administrado, o género, o tempo e a via de administração, o estado geral de saúde e outros fármacos que estejam a ser administrados concomitantemente. As doses preferidas para a administração de 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina estão descritas aqui a seguir. As composições podem ser administradas localmente ou sistemicamente. A administração normalmente será parentérica, por exemplo, intravenosa ou oral. Num enquadramento preferido, a composição farmacêutica administra-se subcutaneamente e, num enquadramento ainda mais preferido, intravenosamente. Noutro enquadramento preferido, a composição farmacêutica é administrada oralmente. As preparações para administração parentérica incluem soluções, suspensões e emulsões esterilizadas, aquosas ou não aquosas. Exemplos de dissolventes não aquosos são propileno-glicol, polietileno-

glicol, óleos vegetais, tais como, azeite e ésteres orgânicos injectáveis, tais como, oleato de etilo. Os veículos aquosos incluem água, soluções, emulsões ou suspensões alcoólicas/aquosas, incluindo meios salinos e tamponados. Os veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado ou óleos não voláteis. Os veículos intravenosos incluem fluidos e nutrientes de recarga, recargas de electrólitos (tais como, as que são à base de dextrose de Ringer) e similares. Também podem estar presentes conservantes e outros aditivos, tais como, por exemplo, anti-microbianos, antioxidantes, agentes de quelação e gases inertes e similares. Além disso, a composição farmacêutica pode conter veículos proteínácios como, por exemplo, albumina de soro ou imunoglobulina, preferencialmente de origem humana. Ainda se pode considerar que a composição farmacêutica pode conter, para além da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina, outros agentes activos sob o ponto de vista biológico, consoante a utilização pretendida para a composição farmacêutica num tratamento que compreende a administração de agentes adicionais para uma terapia concomitante. Exemplos desses outros agentes activos, sob o ponto de vista biológico, estão descritos aqui a seguir no contexto das utilizações e dos processos que compreendem uma terapia concomitante.

Até agora não foi descrito nesta técnica nenhum efeito farmacológico, tal como, algum efeito citotóxico ou de sensibilidade ao rádio da 3-iodo-L-fenilalanina (IMA) ou da 4-iodo-L-fenilalanina (IFA) nas células malignas. De acordo com novas verificações surpreendentes da presente invenção identificou-se um efeito citotóxico dos derivados de fenilalanina em todas as linhagens de células malignas ensaiadas para concentrações no intervalo de 0,1 a 0,3

umole/mL, o que pode ser grosseiramente traduzido numa dose para um ser humano num intervalo de 7 a 21 mmole/70 kg do peso do corpo, correspondendo a uma dose de 2 a 6 g/kg do peso do corpo, assumindo uma distribuição equitativa por todo o corpo. Verificou-se contudo que a 4-[¹²³I]iodo-L-fenilalanina está enriquecida em certos tumores por um factor de 20 ou maior, indicando potencialmente uma dose efectiva sob o ponto de vista clínico de 100 a 300 mg/70 kg do peso do corpo ou 1 a 5 mg/kg do peso do corpo (8). Além disso, verificou-se surpreendentemente, que esse derivados de fenilalanina são capazes de se acumular especificamente em gliomas de grau baixo ou elevado, assim como, outras células/tecidos malignos, que podem ser considerados dentro dos anteriores consoante a definição dada para neoplasia maligna. Ao contrário, a 2-iodo-L-fenilalanina, um exemplo de um orto-isómero de 4-(para)iodo-L-fenilalanina (IFA) e os análogos halogenados de D-fenilalanina revelaram apenas uma baixa absorção e uma citotoxicidade moderada nas células neoplásicas quando comparado com IFA e IMA. Isto mostra o efeito superior de 3-iodo-L-fenilalanina e de 4-iodo-L-fenilalanina nas células e tecidos malignos, em comparação com outros compostos.

A acumulação específica da 3-iodo-L-fenilalanina e da 4-iodo-L-fenilalanina leva a uma retenção surpreendentemente marcada por parte das células ou dos tecidos malignos. Assim, a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina têm um efeito citostático nessas células ou tecidos malignos. Além disso, as referidas L-fenilalaninas halogenadas, tal como, 4-iodo-L-fenilalanina (IFA) mostram actividades anti-tumor marcadas e aumentam a radio-sensibilidade em células de tumor primário, incluindo glioblastomas humanos, cancro prostáticos, do ovário e da mama, mielomas múltiplos e melanomas malignos.

No que respeita à toxicidade da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina é conhecido na técnica, para a 4-iodo-L-fenilalanina (IFA) que a DL_{50} é > 100 mg/kg em ratos [9]. A DL_{10} para a IFA administrada por via de injeções i.p. tem sido determinada experimentalmente como sendo > 27 mg/kg em ratos. Além disso, a DL_{50} descrita para a L-fenilalanina administrada por via de injeções i.p. está de acordo com o fabricante, que é de 5.280 mg/kg em ratos. Assim, a toxicidade da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina está numa taxa aceitável de eficácia vs. toxicidade, em níveis de doses eficazes. Além disso, a capacidade de transporte para a IFA em células de tumor não mostrou saturação até 200 μ mole/L, confirmando a capacidade relativamente elevada do sistema de transporte, assim como a via para a terapia do tumor. Para além da sua actividade citostática, verificou-se que a 3-iodo-L-fenilalanina e a 4-iodo-L-fenilalanina exercem um efeito radio-sensibilizador intrínseco significativo, que potencia o efeito citocídico da radiação terapêutica administrada concomitantemente.

De acordo com isto, a referida 3-iodo-L-fenilalanina e a referida 4-iodo-L-fenilalanina representam uma nova classe de compostos atractiva para produtos farmacêuticos terapêuticos para o tratamento de tumores, por meio dos quais uma dose citotóxica efectiva se pode concentrar selectivamente na devastação de células de tumor, ao mesmo tempo que poupam os tecidos normais. Além disso, a L-fenilalanina halogenada com iodo na posição 3-(meta-) ou 4-(para-) são compostos activos sob o ponto de vista citostático que exibem perfis de tolerância favoráveis. Uma terapia que utilize as L-fenilalaninas halogenadas, 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, podem por isso ultrapassar as estratégias de desintoxicação celular. Devido à actividade anti-tumor, o composto é uma alternativa para a terapia de manutenção ou de

indução em cancro avançados e para a melhoria da tolerância e da eficácia dos regimes de quimioterapia que já existem.

Numa utilização preferida da presente invenção, administra-se a composição farmacêutica a um indivíduo, em que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina são geralmente administradas numa dose de 0,001 a 100 mg/kg do peso do corpo do indivíduo. Mais preferencialmente, a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina dão-se numa dose de 0,1 a 25 mg/kg do peso do corpo do indivíduo e, mais preferencialmente, a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina dão-se numa dose de 1,0 a 25 mg/kg de peso do corpo do indivíduo.

De acordo com outra utilização preferida da presente invenção, a L-fenilalanina halogenada é a 4-iodo-L-fenilalanina.

É preferível que a neoplasia maligna seja seleccionada de um grupo que consiste em glioma maligno, mieloma múltiplo, melanoma maligno, cancro da próstata e da mama. Mais preferencialmente, selecciona-se o glioma no grupo que consiste em glioblastoma multiforme, astrozitoma anaplásico, astro-oligodendroglioma, oligoastrocitoma e ependimoma.

Ainda preferível para utilização da presente invenção que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina tenham um efeito de radio-sensibilização nas células malignas ou nos tecidos da neoplasia, um efeito citostático e/ou um efeito de reversão de um estado constitutivo ou adquirido de resistência celular à quimioterapia ou à radioterapia.

A expressão "efeito citostático" descreve, no contexto da presente invenção, a capacidade de um composto para

retardar, diminuir ou parar a proliferação de células malignas. A expressão "efeito de radio-sensibilização" descreve, no contexto da presente invenção, a capacidade de um composto para melhorar a resposta terapêutica a uma terapia de radiação administrada concomitantemente, em que a terapia de radiação inclui a terapia de radiação externa ou interna, correspondendo à indução de uma resposta acrescida ou aumentada a uma dada dose de radiação administrada na presença do composto de radio-sensibilização, comparada com a resposta induzida pela mesma dose de radiação, na ausência do composto de radio-sensibilização ou, alternativamente, a indução selectiva da sensibilidade das células neoplásicas à radioterapia, não presente e na ausência do composto.

A expressão "um efeito para reverter um estado constitutivo ou adquirido de resistência celular a quimioterapia ou radioterapia" descreve, no contexto da presente invenção, a capacidade de um composto para converter ou para reconverter a sensibilidade celular para uma quimioterapia ou para uma radioterapia.

Além disso, prefere-se que a composição farmacêutica ainda contenha um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico, um agente de gene terapêutico, uma vacina, um agente terapêutico de nucleótido anti-paralelo, um agente terapêutico de ARNsi e/ou um agente endoradioterapêutico. A administração de um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico, um agente terapêutico de genes, uma vacina, um agente terapêutico de nucleótido anti-paralelo, um agente terapêutico de ARNsi e/ou um agente endoradioterapêutico é entendida como uma terapia concomitante. Os processos e os meios para essas terapias concomitantes são bem conhecidos na técnica.

A 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina e os agentes terapêuticos adicionais podem ser formulados como uma única composição farmacêutica para administração simultânea dos compostos eficazes ou em composições farmacêuticas separadas para administração sequencial. De acordo com isto, uma administração de um composto que compreende 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina antes da administração de uma composição que compreende um ou mais agentes terapêuticos seleccionados no grupo de agentes quimioterapêuticos, agentes imunoterapêuticos, gene terapêutico, vacina, agente terapêutico de nucleótido anti-paralelo, agente terapêutico de ARNsi e agente endoradioterapêutico, é considerada tanto em simultâneo como numa administração sequencial.

Um exemplo de um agente quimioterapêutico compreende agentes bioactivos conhecidos por serem eficazes no retardamento ou na paragem do crescimento maligno ou por serem eficazes na regressão ou na eliminação de tecidos ou de células malignas. Esses agentes podem ser, por exemplo, fármacos que actuam como citostáticos. De acordo com isto, uma quimioterapia compreende, em linha com os padrões médicos em qualquer tratamento sistémico ou local, a administração de agentes citostáticos ou citotóxicos. Os agentes quimioterapêuticos utilizados em oncologia incluem, entre outros, compostos nitrosos de ureia (ACNU [nimustina], BCNU [carmustina], CCNU [lomustina]), temozolomide, procarbacina, metotrexato, citarabina, gencitabina, fluorouracilo, ciclofosfamida, mitoxantrona, antraciclinas, estramustina ou taxanos. Os agentes quimioterapêuticos destinam-se a ser administrados em regimes de dosagem apropriados de acordo com a prática clínica. Em linha com a presente invenção, os agentes quimioterapêuticos preferidos são compostos nitrosos de ureia, temozolomide, procarbacina e metotrexato. Exemplos

de um agente imunoterapêutico compreendem, mas não se limitam a, compostos, tais como, anticorpos, fragmentos de anticorpos e/ou os seus derivados, que detectam especificamente tecidos ou células malignas e/ou agentes terapêuticos celulares, incluindo os que consistem em células autólogas, heterólogas xenogénicas ou endógenas transferidas adoptivamente, que têm a capacidade de eliminar células ou tecidos malignos. A expressão "fragmento de anticorpo ou os seus derivados" refere-se a anticorpos de cadeia simples ou os seus fragmentos, anticorpos sintéticos, fragmentos de anticorpos, tais como, Fab, F(ab2)', Fv ou fragmentos de scFv, anticorpos de domínio único, etc., ou um derivado quimicamente modificado de qualquer um deles. Os anticorpos que se utilizam de acordo com a presente invenção ou as suas cadeias de imunoglobulina correspondentes podem ainda ser modificados fora dos elementos utilizando técnicas convencionais conhecidas neste domínio, por exemplo, utilizando eliminações, inserções, substituições, adições e/ou recombinações e/ou quaisquer outras modificações de aminoácidos (por exemplo, modificações pós-tradução e modificações químicas, tais como, glicosilação e fosforilação) conhecidas nesta técnica, quer isoladamente ou em combinação. Os processos para a introdução dessas modificações na sequência do ADN subjacente à sequência de aminoácidos de uma cadeia de imunoglobulina são bem conhecidos dos especialistas na matéria; ver, por exemplo, Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edição 1989 e 3ª edição 2001. A detecção específica de tecidos ou de células malignas pode ser efectuada por via da detecção de marcadores específicos do tumor por meio de anticorpos, fragmentos de anticorpos e/ou os seus derivados. Um marcador específico do tumor é um antigénio da superfície das células associadas ao tumor, que se encontra exclusivamente nas células do tumor ou

é sobre-expresso nas células do tumor quando comparado com células não malignas. Os antigénios da superfície das células associadas ao tumor podem ser expressos não apenas nas células do tumor mas também nas células/tecidos que não são essenciais para a sobrevivência ou que podem ser recarregados por células tronco que não expressam os antigénios das superfícies das células associadas ao tumor. Além disso, um antigénio da superfície das células associadas ao tumor pode ser expresso em células malignas e em células não malignas mas é mais acessível por meio de um agente terapêutico de interesse nas células malignas. Exemplos de antigénios da superfície das células associadas ao tumor, sobre-expressos, são Her2/neu, receptor de FCE, Her-3 e Her-4. Um exemplo de um antigénio de superfície de célula associada ao tumor, que é específico do tumor, é o FGERV-III. Um exemplo de um antigénio da superfície da célula associada ao tumor, que está presente numa célula que não é essencial para a sobrevivência, é o PSMA. Exemplos de antigénios das superfícies das células associados ao tumor, que estão presentes nas células que são recarregadas, são CD19, CD20 e CD33. Um exemplo de um antigénio da superfície da célula associada ao tumor, que está mais acessível num estado maligno do que num estado não maligno, é o EpCAM. Além disso, a definição de "agentes imunoterapêuticos" pode compreender agentes, tais como moléculas co-estimuladoras das células T ou citocinas ou agentes de activação das células B, células NK (células naturais assassinas) ou outras células do sistema imunitário, assim como, fármacos que inibem as reacções imunitárias (por exemplo, corticosteróides).

A expressão "agente terapêutico de genes" define, no contexto da presente invenção, meios para uma terapia que compreende a administração de uma ou mais estruturas de ácidos nucleicos codificando funcionalmente, por exemplo, um

ou mais antigénios que são característicos das células malignas. Esses antigénios compreendem marcadores específicos de tumores. A sequência que codifica esse antigénio está operacionalmente ligada a uma sequência de ácidos nucleicos que é uma sequência reguladora. Assim, uma terapia de genes compreende a expressão funcional de um gene heterólogo, num paciente, de acordo com protocolos médicos padronizados, utilizando sistemas de vectores apropriados conhecidos na técnica; ver, por exemplo, Haberkorn et al., Curr Med Chem. 2005; 12 (7): 779-94. A expressão "sequência reguladora" refere-se a sequências de ADN que são necessárias para efectuar a expressão de sequências de codificação às quais estão ligadas. As sequências de controlo, no contexto da terapia de genes descrita, incluem geralmente promotores, terminadores e, nalguns casos, melhoradores, trans-activadores ou factores de transcrição. A expressão "sequência de controlo" significa, no mínimo, todas as componentes cuja presença é necessária para a expressão e podem também incluir componentes adicionais vantajosos. A expressão "operacionalmente ligado" refere-se a um arranjo/configuração em que os componentes assim descritos estão numa relação que lhes permite funcionar da maneira pretendida. Uma sequência de controlo "operacionalmente ligada" a uma sequência de codificação está ligada de tal maneira que a expressão da sequência de codificação consegue-se em condições compatíveis com as sequências de controlo.

A administração de uma vacina, no contexto da presente invenção, destina-se à activação do sistema imunitário de uma forma inata ou adaptada de modo a que o paciente aja contra as células malignas ou os tecidos do tumor. Essa terapia inclui, por exemplo, a administração de uma ou mais preparações de antigénios contendo substâncias do tumor ou

células seleccionadas para reagir contra o tecido do tumor ou as células malignas.

Um agente terapêutico anti-paralelo é, por exemplo, uma sequência de nucleótidos que seja complementar das sequências de genes específicas do tumor, cujo objectivo é neutralizar funcionalmente a expressão de genes do tumor e, conseqüentemente, induzir a morte das células do tumor. Um agente terapêutico de ARNsi é, por exemplo, um ARN de interferência pequena, capaz de silenciar especificamente a sequência de expressão e de actividade de vários genes-alvo específicos do tumor, por precipitação de uma clivagem de sequências únicas específicos do transcripto do ARNm do gene alvo e uma interrupção da tradução do ARNm alvo, induzindo assim a morte da célula do tumor.

Uma terapia concomitante que requer a administração de um ou mais agentes bioactivos adicionais, que é eficaz no tratamento de neoplasias malignas pode ser acompanhada pela administração de um ou mais compostos adicionais que minimizam potenciais efeitos secundários dos referidos agentes bioactivos, tais como, fármacos que actuam no sistema gastrointestinal, fármacos que previnem a hiperuricémia e/ou fármacos que actuam no sistema circulatório, por exemplo, na pressão sanguínea, conhecidos na técnica. Esses agentes bioactivos adicionais podem ser formulados sob a forma da mesma composição farmacêutica ou em composições farmacêuticas separadas.

A expressão "agente endoradioterapêutico" define, no contexto da presente invenção, um agente que compreende pelo menos um tipo de isótopo radioactivo. Esse agente destina-se a ser administrado a um indivíduo que dele necessite e é eficaz na terapia da neoplasia maligna descrita antes devido

a uma radiação endogénica, isto é, uma radiação com o composto radioactivo dentro do corpo do indivíduo a ser tratado por meio da endoradioterapia. Num enquadramento preferido, a composição farmacêutica descrita compreende uma combinação de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina, em que o iodo é o isótopo não radioactivo estável [^{127}I]-iodo e um agente endoradioterapêutico que é uma L-fenilalanina halogenada, em que o isótopo de halogéneo se selecciona no grupo de isótopos bromo-76, bromo-77, bromo-82, iodo-123, iodo-124, iodo-125, iodo-131 e astatina-211 emitindo electrões alfa-, beta- ou de Auger-. Prefere-se que o isótopo de halogéneo seja também conjugado com a L-fenilalanina na posição 3-(meta-) ou 4-(para-). A expressão "isótopos que emitem electrões alfa-, beta- ou de Auger" define, no contexto da presente invenção, isótopos radioactivos, caracterizados pela emissão de diferentes partículas (raios) formados durante a diminuição da radioactividade ou por processos de transição nuclear. Um isótopo emitindo electrões alfa define-se como um nuclídeo radioactivo que emite partículas alfa, correspondendo a um núcleo de hélio, que consiste em dois protões e dois neutrões. Um isótopo que emite partículas beta define-se como um nuclídeo que emite electrões nucleares rápidos (negatrões) formados durante a diminuição da radioactividade. Um isótopo que emite electrões de Auger define-se como um nuclídeo que emite electrões de energia nuclear baixa formados pela captura de electrões nucleares ou por processos de transição internos. Os comprimentos máximos dos trajectos destas partículas estão num intervalo de 10 nm a 12 mm.

O semi-período de vida físico dos citados radionuclídeos é de 16,2 h para o bromo-76, 57,04 h para o bromo-77, 35,3 h para o bromo-82, 13,27 h para o iodo-123, 4,17 d para o iodo-124, 59,41 d para o iodo-125, 8,02 d para o iodo-131 ou 7,21

h para a astatina-211. O semi-período de vida físico do conjugado de L-fenilalanina marcado com estes radionuclídeos corresponde ao semi-período de vida do respectivo radionuclídeo. A mistura preferida de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina com um agente endoradio-terapêutico é com uma L-fenilalanina halogenada. Preferencialmente, a maioria dos isótopos estáveis de iodo e alguns isótopos de halogéneo da mistura preferida seleccionados no grupo dos isótopos halogenados identificados antes podem ser obtidos, por exemplo, por meio de uma permuta de halogéneos não isotópicos (adicionados ao veículo/c.a.). Alternativamente, a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina compreende apenas isótopos de [¹²⁷I]-iodo não radioactivos e estáveis, que se podem misturar com uma preparação de L-fenilalanina halogenada compreendendo apenas ou maioritariamente isótopos radioactivos não estáveis. Esta última preparação pode ser obtida, por exemplo, por meio de uma preparação sem veículo adicionado (s.v.a.) que está praticamente isenta de isótopos estáveis do elemento em questão. São igualmente preferidas outras misturas alternativas de preparações estáveis, não radioactivas com preparações radioactivas não estáveis.

Geralmente, prefere-se que o isótopo que emite partículas alfa-, beta- ou electrões de Auger- seja administrado em doses de 10^{-5} a 10^{-18} g/kg do corpo. Mais preferencialmente, o isótopo que emite partículas alfa-, beta- ou electrões de Auger- seja administrado em doses de 10^{-7} a 10^{-15} g/kg do peso do corpo e, mais preferencialmente, em doses de 10^{-8} a 10^{-10} g/kg do peso do corpo. Prefere-se particularmente que essa dose seja formulada ou que contenha 1 a 10, preferencialmente, 2 a 5 mL de uma solução esterilizada, tal como soluções salinas tamponadas com fosfato, água para injeções, etc.

Adicionalmente prefere-se que a dose de radiação dos isótopos que emitem partículas alfa-, beta- ou electrões de Auger- esteja no intervalo de 0,1 a 1.000 MBq/kg do peso do corpo. Mais preferencialmente, a dose de radiação dos isótopos que emitem partículas alfa-, beta- ou electrões de Auger- esteja no intervalo de 10 a 400 MBq/kg do peso do corpo e, mais preferencialmente, a dose de radiação dos isótopos que emitem partículas alfa-, beta- ou electrões de Auger- esteja no intervalo de 20 a 120 MBq/kg do peso do corpo. Determina-se a dose administrada utilizando um medidor de dose apropriado, calibrado para medir quantitativamente radiação alfa, beta ou gama.

É preferível que a dose de radiação dos isótopos que emitem radiações alfa-, beta- ou electrões de Auger- seja administrada como uma dose única, numa só vez ou em doses fraccionadas em 2 a 60 fracções ou como doses contínuas dadas diariamente até que a doença progrida novamente ou até à morte do paciente. Tal como descrito aqui antes, a administração das composições farmacêuticas descritas resulta numa intersecção ou numa desaceleração do desenvolvimento do cancro devido ao efeito citostático de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina. Apesar disso, a doença pode ainda progredir após a intersecção ou a desaceleração e o doente pode morrer. Mais preferencialmente, o conjugado deve ser administrado geralmente de uma forma fraccionada em 2 a 10 fracções. Prefere-se também que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina seja administrada como uma terapia de manutenção crónica. Prefere-se que se dê uma dose contínua todos os dias. O fraccionamento da dose é um processo estabelecido na terapia da radiação. Fraccionando uma dose total administrada, aumenta-se a tolerância para os tecidos saudáveis que não são alvo do tratamento, assim como, se aumenta o efeito citotóxico para o tecido do tumor. A

radiação fraccionada repetida permite impactar de uma forma terapêutica uma percentagem mais elevada das células em estádios sensíveis à radiação do ciclo da célula, comparada com uma radiação com uma dose elevada feita uma única vez. A radiação terapêutica induz quebras dos filamentos simples e duplos do ADN, que são contra-atacadas por mecanismos de reparação nucleares, que são sobre-regulados no seguimento da radiação. Crê-se assim que as células que sofrem reparação do ADN são mais susceptíveis a uma radiação renovada do que as células que sofrem uma radiação pela primeira vez.

Num outro enquadramento preferido, os isótopos halogenados radioactivos são p-[¹³¹I]iodo-L-fenilalanina (IFA-131), 4-[¹²⁴I]iodo-L-fenilalanina (IFA-124) e/ou p-[²¹¹At]astatina-L-fenilalanina (AtPA-211). O iodo-131 está muito disponível, tem um semi-período de vida favorável e pode ser manuseado pela maior parte das instituições licenciadas para aplicar radionuclídeos abertos. O iodo-131 permite uma monitorização extracorporal conveniente da terapia utilizando uma câmara de raios gama, provida de um componente de raios gama, emitido numa taxa fixa relativamente à emissão das partículas beta terapêuticas, as quais não são detectáveis extra-corporalmente. Uma outra forma de realização preferida do processo da presente invenção faz uso de 4-[¹²⁴I]iodo-L-fenilalanina. O iodo-124 tem uma componente de emissão de positrões que permite produzir imagens por PET (tomografia por emissão de positrões), para além da emissão beta terapêutica. Utilizando uma produção quantitativa de imagens por meio de PET, as medições da dosimetria interna numa base de continuidade podem ser realizadas por meio do planeamento de uma terapia e por meio da monitorização da terapia por um período até 15 dias no seguimento de uma única injeção. A astatina-211 também é uma das preferidas já que emite partículas alfa de

elevada energia (6,8 MeV), com um percurso com um comprimento curto no tecido (65 μm), o que permite administrar uma reacção altamente citotóxica ao tecido alvo, ao mesmo tempo que se minimizam os efeitos indesejáveis da radiação para o tecido não alvo.

Na utilização da presente invenção é preferível que a composição farmacêutica seja administrada a um paciente e que este paciente seja em seguida submetido a uma radiação percutânea (radioterapia percutânea ou uma terapia de radiação de campos externo). Essa terapia de radiação de campo externo é entendida, no contexto da presente invenção, como uma terapia concomitante.

A terapia de radiação de um campo externo é normalmente feita como uma radiação de um feixe externo proveniente, entre outras, de fontes radioactivas de cobalto-60, fontes de aceleradores lineares, prótons, neutrões ou feixes de hádron. Preferencialmente, a radiação começa num período de 0 a 7 dias subsequentes à administração de 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina. Mais preferencialmente, a radiação começa num período de 0,5 a 24 horas subsequente à administração de iodo-L-fenilalanina. A radioterapia concomitante pode incluir uma radiação externa cumulativa no paciente, numa dose de 1 a 100 Gy. Um intervalo preferido para a dose de radiação é de 1 a 60 Gy. Prefere-se que a dose de radiação externa seja administrada em doses fraccionadas entre 1 a 60, mais preferencialmente, entre 5 a 30 doses fraccionadas. Preferencialmente, as doses fraccionadas são administradas ao longo de um período de 1 a 26 semanas, mais preferencialmente, ao longo de um período de 6 a 12 semanas. De acordo com a presente invenção, a expressão "dose fraccionada" entende-se como significando que a actividade global da dose fraccionada se soma ou praticamente se soma à

radiação externa cumulativa de forma a conseguir-se o mesmo resultado que com a administração com uma dose única.

Num enquadramento alternativo da presente invenção, providencia-se um processo para o tratamento de neoplasia maligna, processo esse que compreende as etapas de administração de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina a um indivíduo que dela necessite. Prefere-se que o composto eficaz de 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina seja formulado sob a forma de uma composição farmacêutica. A expressão "composição farmacêutica" já foi definida aqui antes. A via de administração do composto eficaz depende *inter alia* da sua formulação. As diferentes vias para as composições, formuladas diferencialmente, já foram descritas aqui antes. Prefere-se particularmente, para o processo da presente invenção, que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina sejam administradas intravenosamente ou oralmente.

Prefere-se ainda que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina sejam administradas ao indivíduo em doses de 0,001 a 100 mg/kg do peso do corpo do indivíduo. Mais preferencialmente, a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina são administradas numa dose de 0,1 a 25 mg/kg de peso do corpo do indivíduo e, mais preferencialmente, a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina é administrada numa dose de 1,0 a 25 mg/kg de peso do corpo do indivíduo.

Também são preferidas, para o tratamento de neoplasia maligna da presente invenção, as administrações de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina a um indivíduo que delas necessite, em que a L-fenilalanina halogenada é a 4-iodo-L-fenilalanina.

Tal como se definiu aqui antes, prefere-se que a neoplasia maligna seja seleccionada num grupo que consiste em glioma maligno, mieloma múltiplo melanoma maligno, cancro da próstata e da mama. Mais preferencialmente, selecciona-se o glioma no grupo que consiste em glioblastoma, astrozitoma, oligoastrocitoma e ependimoma.

Também é preferível, para o processo da presente invenção, que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina tenham um efeito de radio-sensibilização, um efeito citostático e/ou um efeito de reversão do estado adquirido ou constitutivo de resistência celular à quimioterapia ou à radioterapia nas células ou nos tecidos malignos.

Um esquema preferido de administração para a administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina é um esquema quer de administração de uma dose única de uma vez só ou de administração sequencial da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina em doses fraccionadas, de 2 a 60 fracções da dose ou numa dose contínua dada até que a doença progrida novamente ou até à morte do paciente/indivíduo. Assim, prefere-se que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina sejam administradas como uma terapia de manutenção crónica. Prefere-se que a dose contínua dada diariamente.

Também numa forma de realização preferida do processo da presente invenção para o tratamento de neoplasias malignas, considera-se que o processo pode compreender ainda a etapa de tratamento do indivíduo por meio de uma terapia concomitante. A referida terapia concomitante pode seleccionar-se no grupo que consiste em terapia cirúrgica, quimioterapia, endo- ou exo-radioterapia, imunoterapia, terapia de genes, terapia com

vacina, terapia de nucleótidos anti-paralelos, terapia com ARNsi, terapia intracavitária ou terapia com base num dispositivo.

As definições para quimioterapia, endoradioterapia ou terapia de radiação de um campo externo (a seguir designada por exoradioterapia), imunoterapia, terapia de genes, terapia com vacina, terapia de nucleótidos anti-paralelos e terapia de ARNsi, já foram dadas aqui antes. Os processos e os meios para essas terapias concomitantes são bem conhecidos na técnica. Um exemplo de uma terapia cirúrgica pode compreender uma recessão de um tumor sólido ou de um tecido maligno. Uma outra terapia concomitante, em linha com a presente invenção, compreende a implantação cirúrgica de um dispositivo radioactivo, tal como uma semente radioactiva. Essa semente pode ser implantada localmente no sítio do tumor. A técnica de implantação de dispositivos radioactivos é conhecida na técnica e já foi descrita aqui antes na discussão do estado da técnica. O regime de dose para administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina está preferencialmente de acordo, em termos de tempo, com a terapia concomitante opcional (por exemplo, uma terapia concomitante de radiação de um campo externo ou uma endoradioterapia concomitante). Também se prefere que a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina sejam administradas como uma terapia de manutenção crónica, dada, em combinação com outros agentes, a um paciente com um tumor até que a doença progrida novamente ou até à morte do paciente.

Tal como se descreveu antes, no contexto da utilização da presente invenção, prefere-se um método da presente invenção em que a terapia concomitante é uma exoradioterapia, que compreende a etapa de radiação do indivíduo

percutaneamente, subseqüentemente à administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina. Mais preferencialmente, a etapa de radiação efectua-se 0 a 7 dias depois da administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina. Ainda mais preferencialmente, a radiação começa num período de 0,5 a 24 horas depois da administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina.

A radioterapia concomitante descrita antes compreende uma radiação externa cumulativa dada a um paciente numa dose de 1 a 100 Gy. Um intervalo preferido da dose de radiação é de 1 a 60 Gy. Prefere-se que a dose de radiação externa seja administrada em 1 a 60 doses fraccionadas, mais preferencialmente, em 5 a 30 doses fraccionadas. Preferencialmente, as doses fraccionadas são administradas ao longo de um período de 1 a 26 semanas, mais preferencialmente, ao longo de um período de 6 a 12 semanas. De acordo com a presente invenção, a expressão "dose fraccionada" deve entender-se como significando que a actividade global de cada dose fraccionada adiciona-se ou praticamente adiciona-se à radiação externa cumulativa de um modo que só se poderia alcançar administrando uma dose única.

Também se prefere que a terapia concomitante descrita antes compreenda a administração de um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico, um agente terapêutico de genes, um agente terapêutico de nucleótidos anti-paralelos, um agente terapêutico de ARNsi, uma vacina e/ou um agente endoradioterapêutico ou a implantação de um dispositivo radioactivo. Mais preferencialmente, a administração de um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico, um agente terapêutico de genes, um agente terapêutico de nucleótidos anti-paralelos, um agente terapêutico de ARNsi, uma vacina e/ou um agente

endoradioterapêutico é efectuada antes, simultaneamente e/ou na sequência da administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina.

Prefere-se que o indivíduo a ser tratado pelo processo da presente invenção seja um ser humano.

Num outro enquadramento alternativo, a presente invenção tem por objecto uma composição farmacêutica que compreende 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, em que o iodo é o isótopo estável, não radioactivo [¹²⁷I]-iodo. As composições farmacêuticas, no contexto da presente invenção, já foram descritas em detalhe aqui antes. Prefere-se que a composição farmacêutica da presente invenção compreenda ainda formulações apropriadas de veículos, estabilizantes e/ou excipientes. Exemplos para os veículos, estabilizantes e/ou excipientes correspondentes são conhecidos dos especialistas na matéria e já foram caracterizados aqui antes.

As figuras mostram:

Figura 1:

Cinética da absorção celular de IFA (IFA-123) em linhagens de células de glioma humano, *in vitro*.

Figura 2:

Cinética da absorção celular de IFA (IFA-123) em linhagens de células de melanoma maligno humano, *in vitro*.

Figura 3:

Cinética da absorção celular de IFA (IFA-123) em linhagens de células humanas de cancro da próstata, *in vitro*.

Figura 4:

Avaliação *in vitro* de IFA (ACD-101) em células humanas de glioblastoma primário Tx3868; 4a (em cima, à esquerda): Efeito citostático de IFA dependente da dose em células de glioblastoma humano Tx3868; 4b (em cima, à direita): Efeito das diferentes doses de radiação externa apenas nas células humanas isoladas de glioblastoma Tx3868; 4c (em baixo, à esquerda): Efeito radio-sensibilizador de IFA, dependente da dose, administrada concomitantemente com uma radiação externa de 5 Gy em células de glioblastoma humano Tx3868; 4d (em baixo, à direita): Efeito radio-sensibilizador de IFA, dependente da dose, administrada concomitantemente com uma radiação externa de 10 Gy em células de glioblastoma humano Tx3868.

Figura 5:

Avaliação *in vitro* de IFA (ACD-101) e radiação externa em células humanas de glioblastoma A1207; 5a (em cima, à esquerda): Efeito das diferentes doses de radiação externa apenas em células humanas de glioblastoma A1207; 5b (em cima, à direita): Efeito citostático e radio-sensibilizador de 0,1 mg/mL de IFA administrada concomitantemente com uma radiação externa de 0 - 15 Gy em células humanas de

glioblastoma A1207; 5c (em baixo, à esquerda): Efeito citostático e de radio-sensibilizador de 0,2 mg/mL de IFA administrada concomitantemente com uma radiação externa de 0 - 15 Gy em células humanas de glioblastoma A1207; 5d (em baixo, à direita): Efeito citostático e de radio-sensibilização de 0,3 mg/mL de IFA administrada concomitantemente com uma radiação externa de 0 - 15 Gy em células humanas de glioblastoma A1207.

Figure 6:

Avaliação *in vitro* de IFA (ACD-101) apenas em células humanas de glioblastoma M059K; 6a (em cima, à esquerda): Efeito das diferentes doses de radiação externa apenas em células humanas de glioblastoma M059K; 6b (em cima, à direita): Efeito citostático e de radio-sensibilização de 0,1 mg/mL de IFA administrada concomitantemente com uma radiação externa de 0 - 15 Gy em células humanas de glioblastoma M059K; 6c (em baixo, à esquerda): Efeito citostático e de radio-sensibilização de 0,2 mg/mL de IFA administrada concomitantemente com uma radiação externa de 0 - 15 Gy em células humanas de glioblastoma M059K; 6d (em baixo, à direita): Efeito citostático e de radio-sensibilização de 0,3 mg/mL de IFA administrada concomitantemente com uma radiação externa de 0 - 15 Gy em células humanas de glioblastoma M059K.

Figura 7:

Indução da necrose e da apoptose primárias, dependentes da dose, por meio de IFA + radiação externa (10 Gy) em células humanas de glioblastoma T3868.

Efeito radio-sensibilizador de IFA, dependente da dose, administrada concomitantemente com uma radiação externa de 10 Gy em células humanas de glioblastoma Tx3868: indução de necrose (coloração com iodobenzimida) por meio de 0,1 $\mu\text{mole/mL}$ (Fig. 7a (à esquerda)), indução aumentada da necrose e indução adicional de apoptose (coloração com iodeto de propídio) por meio de 0,3 $\mu\text{mole/mL}$ (Fig. 7b (à direita)).

Figura 8:

Estimativas de Kaplan-Meyer da sobrevivência em ratos RNU, que receberam uma implantação ortotópica (intracerebral) de $0,5 * 10^6$ células A1207, uma linha de células de glioblastoma humano. Sobrevivência dos animais de controlo (verde) e de ratos que receberam 1 mg/kg por dia, de uma injeção de IFA i.p..

A presente invenção será descrita agora com referência aos exemplos que se seguem, que são meramente ilustrativos e não foram construídos como limitativos do âmbito da presente invenção.

Exemplo 1:

A 3-iodo-L-fenilalanina (3-IFA), a 4-[¹²³I]iodo-L-fenilalanina e a 4-iodo-L-fenilalanina (IFA) utilizadas nos

exemplos foram compradas no mercado ou foram sintetizadas antes, tal como descrito previamente na literatura. A menos que seja afirmado de outra forma, todos os outros compostos químicos e solventes são de grau analítico.

Exemplo 2:

Linhas de células e cultura das células

Investigaram-se cinco linhas de células de glioma humano, uma linha de células de glioma de rato, duas linhas de células humanas de cancro da próstata, assim como uma linha de células humanas de cancro da mama e uma linha de células de melanoma. As linhas de células de glioma humano Tx3868 e T5135 (de glioblastoma humano primário multiforme) e a linha de células de glioma de rato C6 foram fornecidas pelo Institute of Human Genetics, Universidade de Saarland (Homburg, Alemanha). As linhas de células de glioma humano de alto grau, designadas como A1207, M059K e U373MG, as células humanas de cancro da próstata PC3 e DU425, a linha de células de carcinoma pancreático PanC1, a linha de células humanas de cancro da mama MCF-07 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) e a linha de células de carcinoma pancreático PaCa44 (estabelecidas pelo Dr. Bulow, Mainz, Alemanha), assim como, as linhas de células de melanoma SK-MEL25 e A101 D foram compradas no mercado ou providenciadas por laboratórios de investigação oncológica da Universidade Medical Center of Saarland (Homburg, Alemanha). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 ou em meio de Eagle modificado por Dulbecco (isento de piruvato de sódio, complementado com L-glicose e piridoxina), respectivamente, complementados com soro bovino fetal (SBF) inactivado pelo calor a 10 % (v/v), penicilina (50 U/mL), estreptomicina (50 µg/mL) e insulina (50 µg/mL; PromoCell, Heidelberg, Alemanha). Mantiveram-se todas as

linhas de células em frascos apropriados numa incubadora humidificada (CO₂ a 5 %), a 37 °C. Antes da experiência, fez-se a tripsinização das culturas de células sub-confluentes com uma solução de tripsina a 0,05 % contendo EDTA a 0,02 % mas sem Ca²⁺ e Mg²⁺ e fez-se uma nova suspensão em meio fresco com várias concentrações de células depois de se fazer a contagem por meio de uma coloração vital num hemocitómetro, consoante o estudo. As células estavam isentas de micoplasmas. A viabilidade das células foi >95 %.

Exemplo 3:

Exemplo de experiências de internalização

Fizeram-se experiências de absorção para avaliar a afinidade dos derivados de L-fenilalanina propostos, para os tumores humanos propostos e para avaliar a sua actividade terapêutica *in vitro*.

Realizaram-se todas as experiências quatro vezes, simultaneamente com 250.000, 500.000 e 10⁶ células de tumores humanos preparadas de fresco, incluindo células humanas de glioma maligno, células de cancro pancreático, prostático e da mama. Antes das experiências, as células sub-confluentes foram tripsinizadas tal como descrito antes. Mexeu-se cuidadosamente a suspensão, transferiu-se para um tubo de centrifugação de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA). Fez-se a centrifugação das células durante 5 min, a 200 x g; retirou-se o sobrenadante resultante e fez-se uma nova suspensão dos péletes em meio de Eagle modificado por Dulbecco, isento de soro, e depois transferiram-se para tubos de Eppendorf, a concentrações de 10⁶ células/mL para as investigações de absorção.

Antes da incubação com a correspondente fenilalanina rádio-marcada, as células de tumor foram pré-incubadas, durante 5 min, em 500 µL de meio, a 37 °C, em tubos de centrifugação de Eppendorf de 1,5 mL. Adicionaram-se alíquotas de 30-50 µL ($10^6 - 1,5 \times 10^6$ cpm) preparadas de fresco, de produtos radio-farmacêuticos e incubaram-se as células a 37 °C/CO₂ a 5 %, durante 1, 2, 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min enquanto se agitava. Bloqueou-se a absorção com 500 µL de SBF arrefecido com gelo (pH 7,4) e deixou-se mais 3 min num banho de gelo, centrifugaram-se as células durante 2 min, a 300 x g, retirou-se o sobrenadante e lavaram-se os péletes três vezes com SBF arrefecido com gelo. Os péletes das células foram contados quanto à sua radioactividade em conjunto com 3 alíquotas de padrões num contador Berthold LB951. A percentagem de ligação dos produtos radio-farmacêuticos foi calculada pela fórmula: (cpm de péletes de células/média dos cpm de padrões radioactivos) x 100. Os resultados foram expressos quer em percentagem da dose aplicada por 10^6 células ou como cpm/1.000 células para uma melhor comparação.

Exemplo 4:

Avaliação da taxa de sobrevivência das células após tratamento com 3/4-iodo-L-fenilalanina. Após o desenvolvimento de um campo confluyente de células, expuseram-se as culturas a 0,1 - 5 µmole/mL do produto farmacêutico correspondente, durante até 48 horas, a 37 °C/CO₂ a 5 %. Numa experiência paralela, fez-se a radiação das células utilizando um acelerador linear de 6-MeV com doses de 2 a 15 Gy ou trataram-se com IFA-131 para comparação da taxa de sobrevivência. Para tornar possível a observação da morfologia das células do glioma, fizeram-se crescer as células em lâminas de vidro padronizadas ou em pratos

normalizados de cultura. Depois, retirou-se o meio e fez-se a fixação das células quer em etanol a 70 %, durante pelo menos 30 min, em gelo, para realizar as análises do fluxo citométrico após coloração ou em formalina a 4 % tamponada, neutra, para análises imuno-histopatológicas.

Exemplo 5:

Modelos de Tumor

Realizou-se uma experiência *in vivo* num modelo de glioma humano intracraniano em ratos RNU para avaliar a eficácia terapêutica da 4-iodo-L-fenilalanina (IFA) em glioma.

Implantaram-se estereotaxicamente células humanas de glioblastoma primário A1207 e T3868 ($0,5 \times 10^6$ células) na região frontal direita de ratos RNU (2 mm na direcção posterior e 2 mm na direcção lateral em relação à intersecção das suturas sagital e da bregma até a uma profundidade de 5 mm) ao mesmo tempo que se dava uma anestesia com hidrato de cloral. Libertou-se a craniectomia com cera de ossos e fechou-se o escalpe.

Administrou-se IFA (1 e 5 mg/kg p.c.) i.p. em ratos portadores de xenoinxertos de glioblastoma humano (n = 9 em cada grupo), começando no dia 1 após a implantação estereotáxica.

Administrou-se IFA diariamente na primeira semana após a implantação e semanalmente no período posterior. Trataram-se mais seis ratos RNU com solução salina que serviram como controlo.

Depois, compararam-se os seguintes parâmetros: tempo médio de sobrevivência, dimensão do tumor e histologia após biópsia.

Exemplo 6

Exames Morfológicos e Histológicos

As células de tumor humano cresceram em lâminas de vidro normalizadas e fixaram-se com formalina neutra a 4 %, tamponada e coraram-se pelo processo de Giemsa. Calculou-se o número de células em 10 campos consecutivos de elevada energia (x 40).

Na autópsia dos ratos, para além dos cérebros, colheram-se outros órgãos incluindo o coração, o fígado, os pulmões, a bexiga, o rim, a pele e o cólon. Cortaram-se os cérebros em lâminas em forma de coroa com cerca de 2 - 3 mm de espessura. Fixaram-se todos os tecidos dos animais em formalina neutra a 4 % tamponada e embeberam-se em cera de parafina. Coraram-se as secções com hematoxilina-eosina e corante de Verhoeff-van Gieson e fizeram-se os exames histopatológicos.

Exemplo 7:

Análise Estatística

A significância estatística entre os diferentes grupos experimentais foi determinada por meio do teste t de Student. Considerou-se significativo um valor de p inferior a 0,05.

Exemplo 8:

Resultados e Discussão

Estudos *In Vitro*

As figuras 1 - 3 mostram exemplos da cinética de absorção de uma IFA em células de tumor humano. Utilizou-se o derivado rádio-marcado 4-[¹²³I]iodo-L-fenilalanina para facilitar a quantificação, utilizando um contador de radiação gama. Tal como se mostrou, a IFA exibiu uma absorção elevada em células humanas de tumor com um aumento crescente ao longo do tempo de investigação. Este resultado dá evidências da elevada afinidade dos produtos farmacêuticos marcados com rádio propostos para os tumores humanos, incluindo os gliomas humanos malignos, os carcinomas pancreáticos, o cancro da próstata e da mama.

O efeito citostático e o efeito de radio-sensibilização de IFA em células de glioma primário humano estão demonstrados nas figuras 4 - 6. Tal como se mostra, o efeito citostático de IFA em células primárias de glioblastoma humano é dependente da concentração e é mais pronunciado quando comparado com a radiação externa até 15 Gy (fig. 4). A combinação de IFA com uma radiação externa leva a uma redução dramática da taxa de sobrevivência das células. As análises por citometria de fluxo de células coradas mostram uma indução de necrose primária e da apoptose dependente da dose, que foi mais significativa do que a causada por radiação externa, mesmo com 15 Gy e mais pronunciada à medida que se aumentava a concentração de IFA. Este resultado atesta o elevado efeito de radio-sensibilização de IFA nas células de glioblastoma (fig. 6). As células sobreviventes continham apenas citoplasma esparso, os núcleos estavam mais pequenos e

continham cromatina acumulada e dispersa. Citologicamente, o modo da morte das células foi a apoptose dado que as células de tumor remanescente continham apenas esparsamente citoplasma e corpos apoptóticos, nas outras células os núcleos estavam mais pequenos e continham cromatina condensada.

Estudos *In Vivo*

Cinco em cada seis ratos não tratados com glioblastoma A1207 morreram entre 12 e 22 dias após a implantação, enquanto quatro em cada seis ratos de controlo com T3868 morreram no prazo de 28 dias. O exame histológico das secções finas do cérebro, após a biópsia, confirmou tumores com características típicas de glioblastoma. Em comparação, seis em cada nove e sete em cada nove ratos estavam ainda vivos no 28º dia após tratamento com IFA (1 e 5 mg/kg), respectivamente.

A figura 8 mostra um exemplo de sobrevivência de ratos não tratados e tratados com IFA, ratos com glioblastomas humanos A1207 de acordo com o processo de Kaplan-Meier, atestando a eficácia de IFA no tratamento de gliomas.

Estes resultados sugerem um elevado potencial terapêutico de 4-iodo-L-fenilalanina para tumores humanos, especialmente para gliomas malignos. Os resultados mostram que a 3-iodo-L-fenilalanina e 4-iodo-L-fenilalanina representam uma nova classe de agentes terapêuticos para a terapia de tumores nalgumas entidades tumorais.

Referências:

1. Hortobagy G, Cancer Control 4; suppl., 1997.

2. O'Day S et al., Cancer Control 9: 31-38, 2002.
3. Nieto Y et al. Biology of blood and marrow transplantation 11: 297-306, 2005.
4. Carlson K et al. Bone marrow transplantation 35: 985-90, 2005.
5. Gruenhagen D et al. Annals of surgery 240: 939-47, 2004.
6. Jager PL, Vaalburg W, Pruijm J, de Vries EG, Langen KJ, Piers DA. Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. J Nucl Med 2001; 42: 432-445.
7. Laverman P, Boerman OC, Corstens FH, Oyen WJ. Fluorinated amino acids for tumour imaging with positron emission tomography. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2002; 29: 681-690.
8. Hellwig D, Ketter R, Romeike BF, Sell N, Schaefer A, Moringlane JR, Kirsch CM, Samnick S: Validation of brain tumour imaging with p-[123I]iodo-L-phenylalanine and SPECT. Eur J Nucl Med Mol Imaging 32: 1041-1049, 2005.
9. S. Samnick, D. Hellwig, B.F. Romeike, J.-R. Moringlane, W. Feiden and C.-M. Kirsch. Initial Evaluation on the feasibility of single photon emission tomography with L-p-[123I]iodophenylalanine for routinely brain tumor imaging. Nucl Med Commun 23: 121-130, 2002.
10. Fukushima K, Toyoshima S. Antitumor activity of amino acid derivatives in the primary screening. Gann. 66(1): 29-36, 1975.

11. Otani TT, Briley MR. Structure-activity relationships among substituted N-benzoyl derivatives of phenylalanine and its analogues in a microbial antitumor prescreen III: derivatives of p-fluoro-DL-phenylalanine. J Pharm Sci. 74(1): 40-43, 1985.
12. Loeffler LJ, Sajadi Z, Hall IH. Antineoplastic agents. 2. Structure-activity studies on N-protected vinyl, 1,2-dibromoethyl, and cyanomethyl esters of several amino acids. J Med Chem 20: 1584-1588, 1977.
13. Otani TT, Briley MR. m- And p-halobenzoyl derivatives of p-halo-DL-phenylalanine as inhibitors in a microbial antitumor prescreen. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 40(2): 325-8, 1983.
14. Otani TT, Briley MR. The study of structure-activity relationships among substituted N-benzoyl derivatives of phenylalanine and its analogs in a microbial antitumor prescreen: II. Derivatives of m-fluoro-DL-phenylalanine. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 40: 321-324, 1983.
15. Kelly CJ, Johnson TC.: Effects of p-clorophenylalanine and alphamethylphenylalanine on amino acid uptake and protein synthesis in mouse neuroblastoma cells. Biochem J. 1978 15;174(3): 931-8.
16. Prohaska JR, Wells WW, Luecke RW.: Effect of phenylalanine and p-clorophenylalanine administration on the development of rat brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase. Proc Soc Exp Biol Med. 1974;147(2): 566-71.
17. Warters RL, Hofer KG, Harris CR, Smith JM. Radionuclid toxicity in cultured mammalian cells:

Elucidation of the primary site of radiation damage. *Curr Top Radiat Res Quar* 12: 389-407, 1977.

18. Zalutsky MR, Bigner DD: Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates. *Acta Oncol* 35: 373-379, 1996.

19. Hofer KG, Keough G, Smith JM. Biological toxicity of Auger emitters: molecular fragmentation versus electron irradiation. *Curr Top Radiat Res Quar* 12: 335-354, 1977.

20. Behr TM, Wormann B, Gramatzki M, Riggert J, Gratz S, Behe M, Griesinger F, Sharkey RM, Kolb HJ, Hiddemann W, Goldenberg DM, Becker W: Low- versus high-dose radioimmunotherapy with humanized anti-CD22 or chimeric anti-CD20 antibodies in a broad spectrum of B cell-associated malignancies. *Clin Cancer Res* 5: 3304-3314, 1999.

Lisboa, 5 de Abril de 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de 3-iodo-L-fenilalanina e de 4-iodo-L-fenilalanina caracterizada pelo facto de se destinar à preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de neoplasia maligna.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a composição farmacêutica conter ainda um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico, um agente terapêutico de genes, uma vacina, um agente terapêutico de nucleótido anti-paralelo, um agente terapêutico de ARNsi e/ou um agente endoradioterapêutico.
3. Utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo facto de a composição farmacêutica ser administrada a um paciente que, em seguida, é submetido a uma radiação percutânea.
4. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, caracterizadas pelo facto de se utilizarem no tratamento de neoplasia maligna.
5. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, ou a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo facto de a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina serem administradas ao indivíduo em doses de 0,001 a 100 mg/kg do peso do corpo do indivíduo.
6. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3 ou 5 ou da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-

fenilalanina de acordo com as reivindicações 4 ou 5, caracterizada pelo facto de a L-fenilalanina halogenada ser a 4-iodo-L-fenilalanina.

7. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3 ou 5 ou 6 ou da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 6, caracterizada pelo facto de a neoplasia maligna se seleccionar no grupo que consiste em glioma maligno, mieloma múltiplo, melanoma maligno, cancro da próstata e da mama.
8. Utilização ou a própria 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o glioma se seleccionar no grupo que consiste em glioblastoma, astrozitoma, oligoastrocitoma e ependimoma.
9. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3 ou 5 a 8 ou a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 8, caracterizada pelo facto de a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina terem um efeito de radio-sensibilização, um efeito citostático ou um efeito para reverter um estado constitutivo ou adquirido de resistência celular à quimioterapia ou à radioterapia, em células ou tecidos malignos.
10. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 9, caracterizada pelo facto de a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina serem administradas intravenosamente ou oralmente.

11. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 10, caracterizada pelo facto de a 3-iodo-L-fenilalanina ou a 4-iodo-L-fenilalanina serem administradas uma única vez, como uma dose única, fraccionadas em doses de 2 a 60 fracções das doses ou em doses contínuas dadas diariamente até que a doença progrida novamente ou até à morte do indivíduo.
12. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 11, caracterizada pelo facto de o indivíduo ser ainda tratado por meio de uma terapia concomitante seleccionada no grupo que consiste em terapia cirúrgica, quimioterapia, endo- ou exoradioterapia, imunoterapia, terapia de genes, terapia com vacina, terapia com nucleótidos anti-paralelos, terapia de ARNsi, terapia intracavitária ou um tratamento à base de um dispositivo.
13. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo facto de a terapia concomitante ser uma exoradioterapia, em que o indivíduo é submetido a uma radiação percutânea no seguimento da administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina.
14. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 13, caracterizadas pelo facto de a radiação ser efectuada 0 a 7 dias após a administração de 3-iodo-L-fenilalanina ou de 4-iodo-L-fenilalanina.

15. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 14, caracterizadas pelo facto de a radiação ser efectuada como uma radiação externa cumulativa num paciente, numa dose de 1 a 100 Gy.
16. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo facto de a terapia concomitante compreender a administração de um agente quimioterapêutico, imunoterapêutico, um agente terapêutico de genes, um agente terapêutico de nucleótido anti-paralelo, um agente terapêutico de ARNsi, uma vacina e/ou um agente endoradioterapêutico ou a implantação de um dispositivo radioactivo.
17. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo facto de a administração de um agente quimioterapêutico, imunoterapêutico, um agente terapêutico de genes, um agente terapêutico de nucleótido anti-paralelo, um agente terapêutico de ARNsi, uma vacina e/ou um agente endoradioterapêutico ser efectuada antes, simultaneamente e/ou na sequência da administração da 3-iodo-L-fenilalanina ou da 4-iodo-L-fenilalanina.
18. 3-Iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo facto de o indivíduo ser um ser humano.
19. Composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de compreender 3-iodo-L-fenilalanina ou 4-iodo-L-fenilalanina, em que o iodo é o isótopo estável, não radioactivo [¹²⁷I]-iodo.

20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo facto de compreender ainda formulações apropriadas de veículos, estabilizantes e/ou excipientes.

Lisboa, 5 de Abril de 2010.

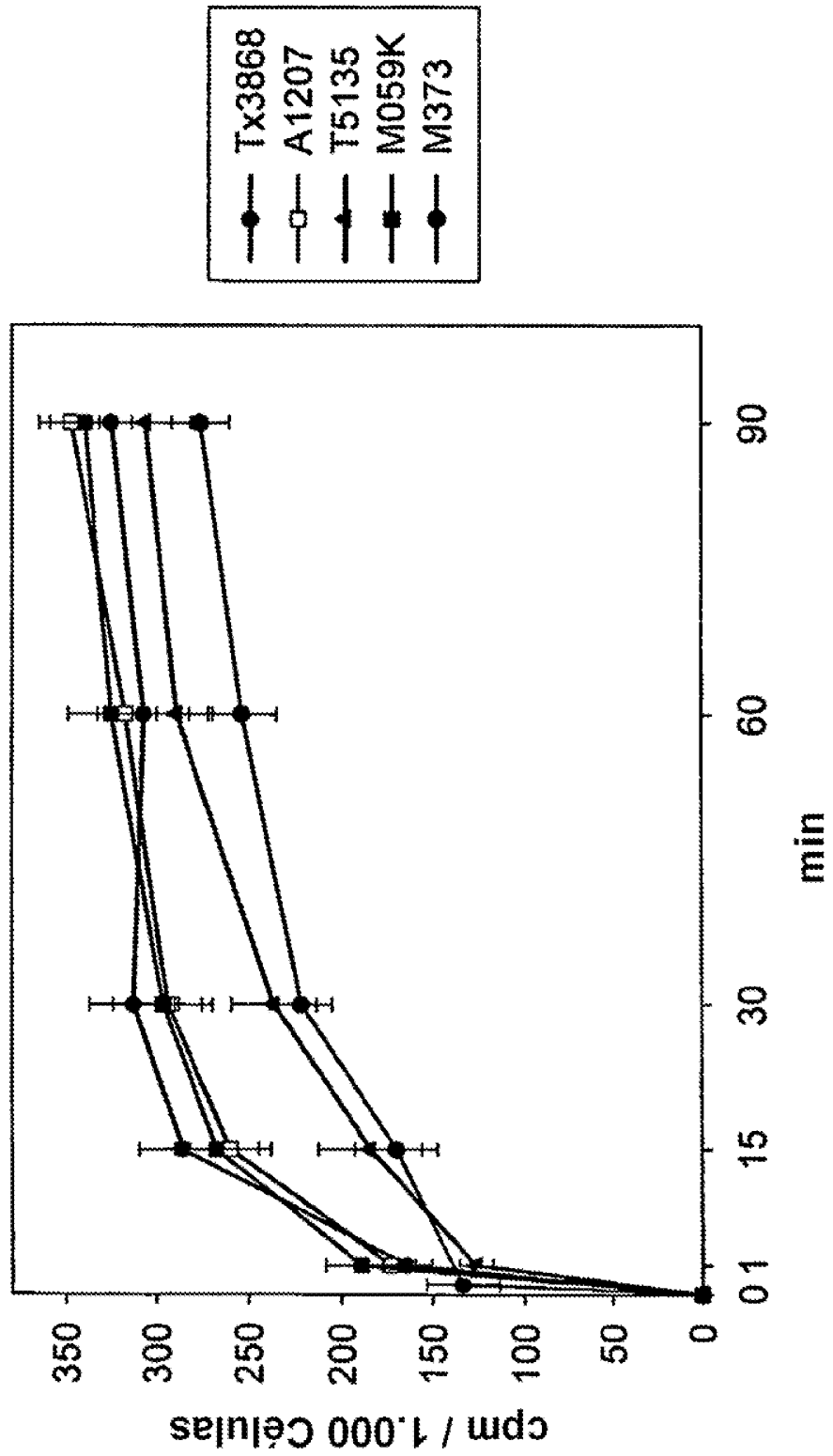


Figura 1

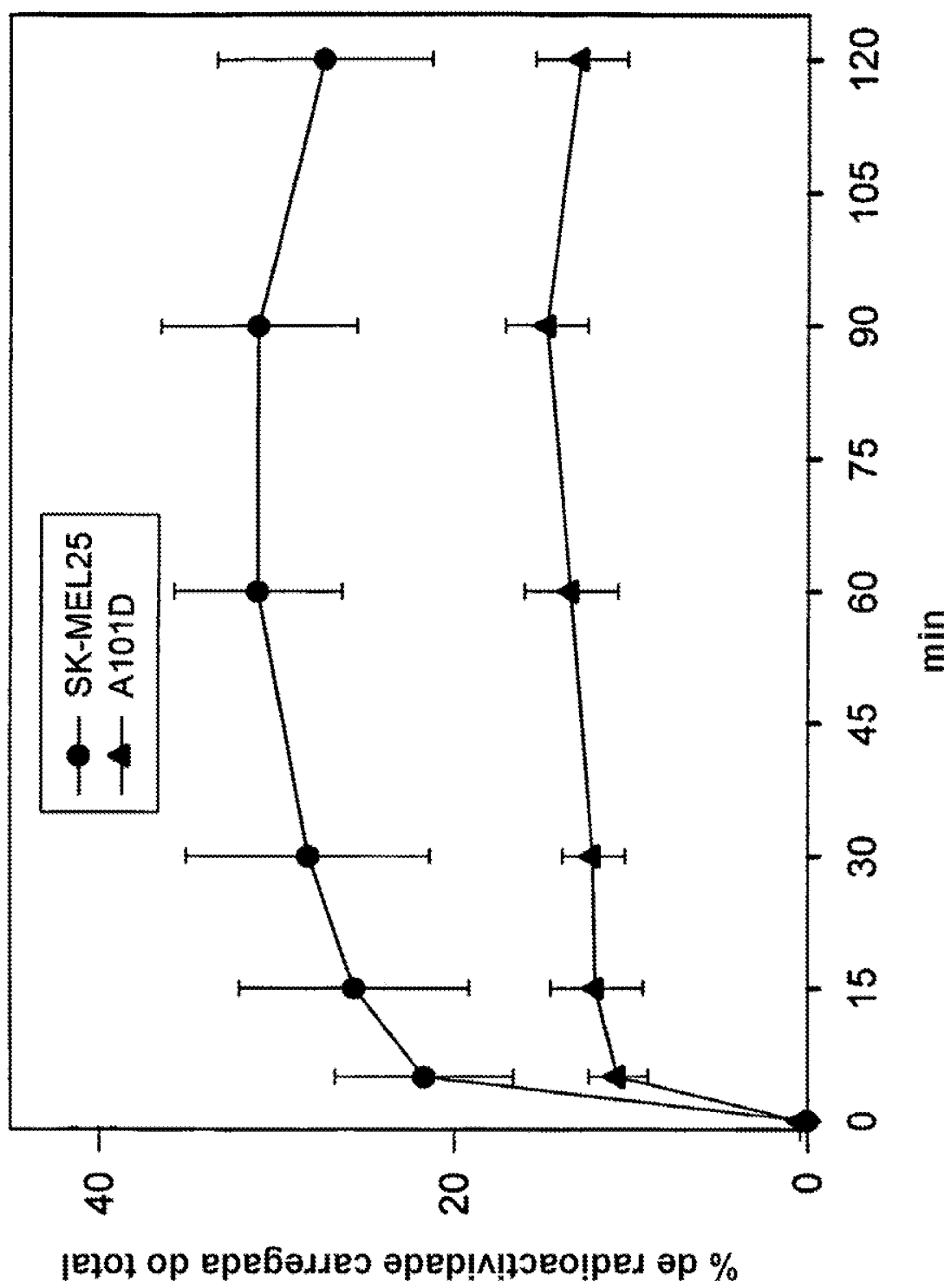


Figura 2

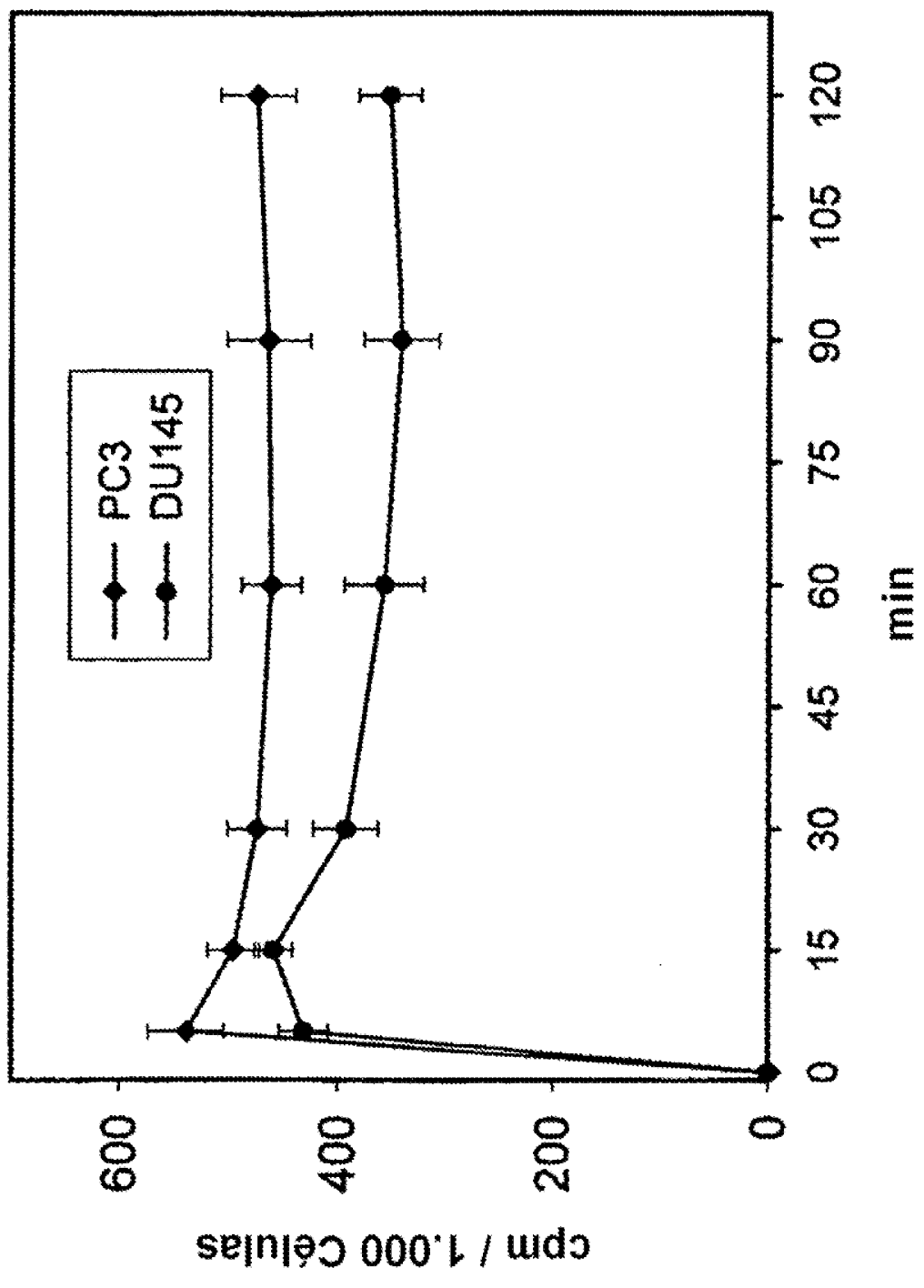


Figura 3

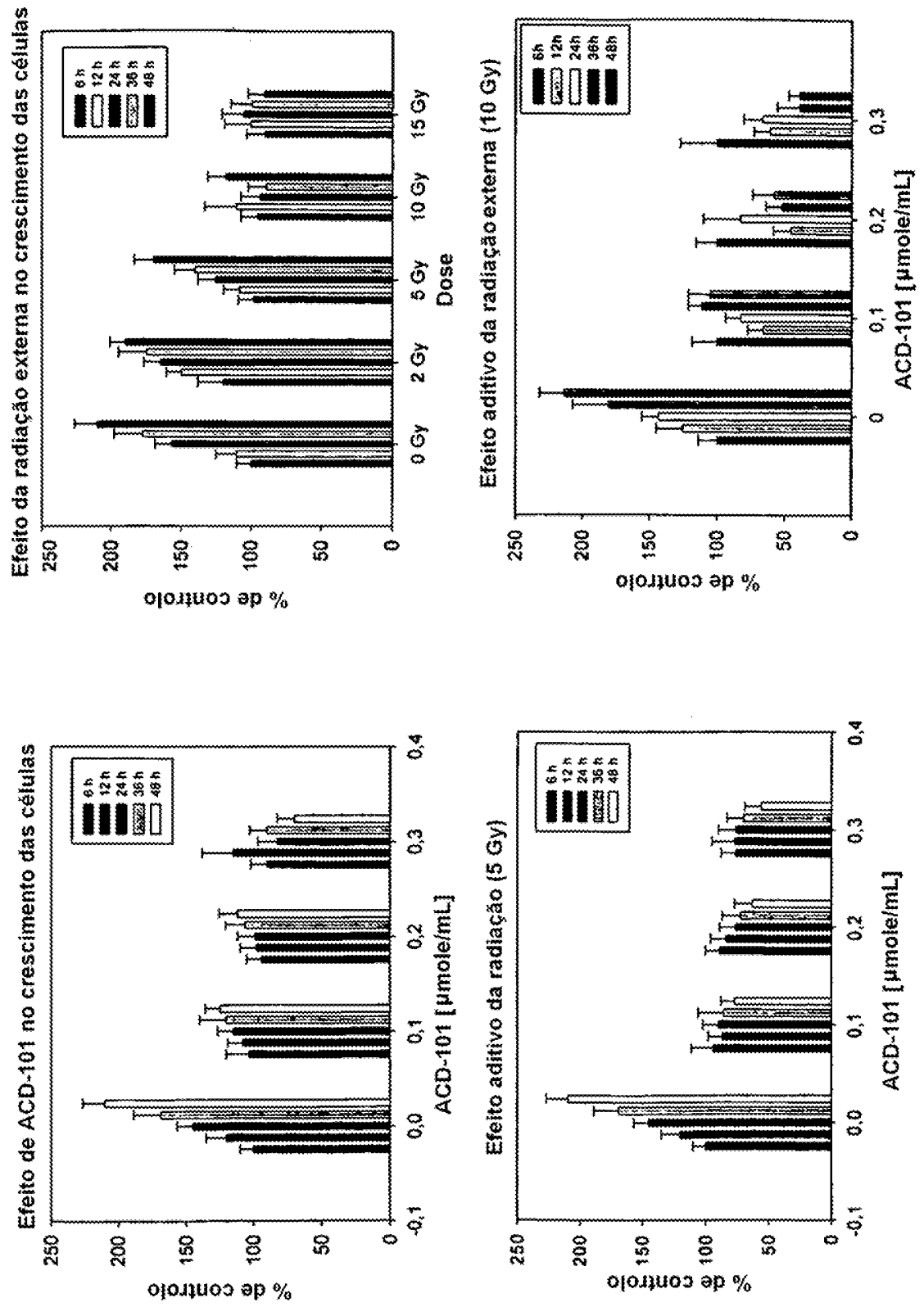


Figura 4

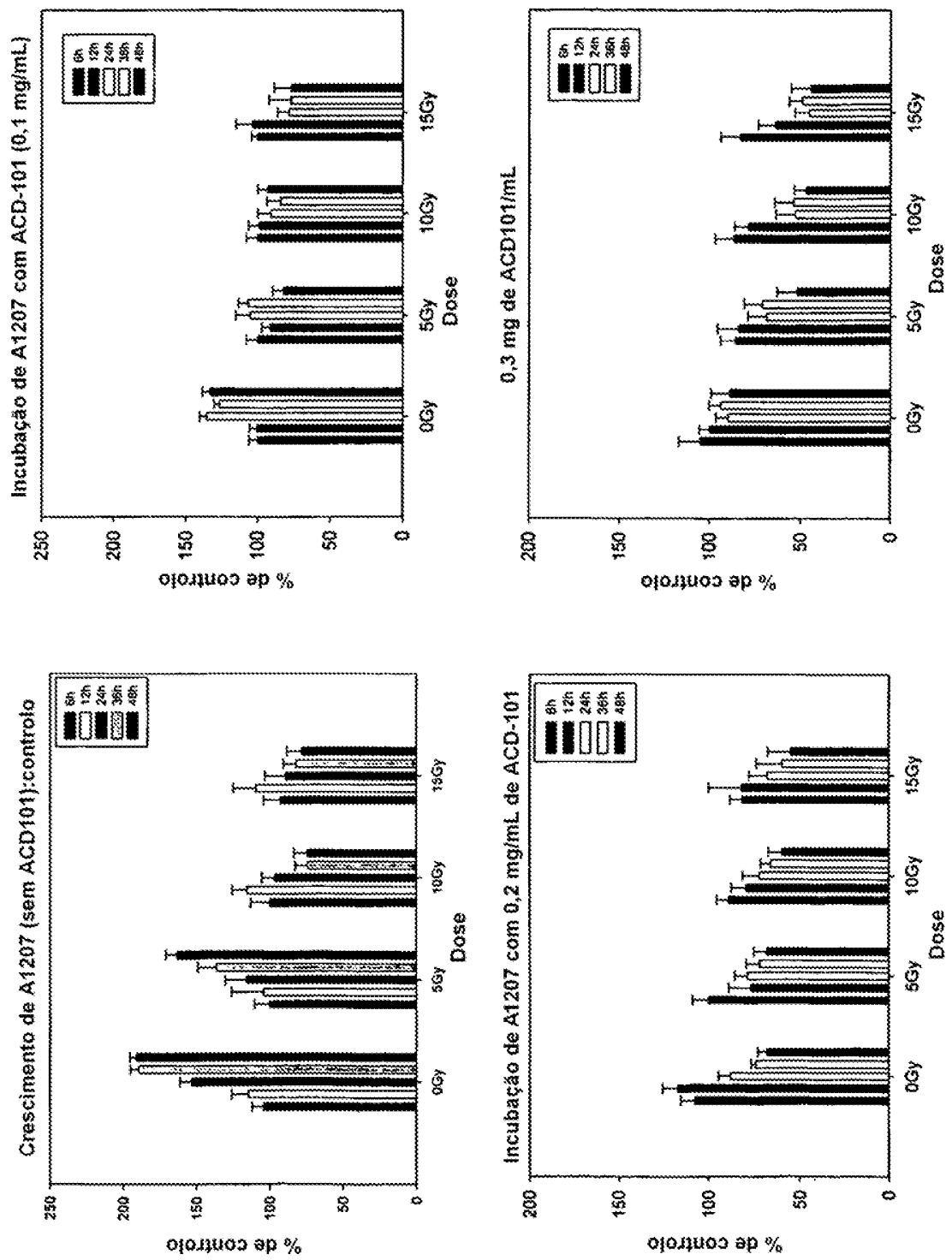


Figura 5

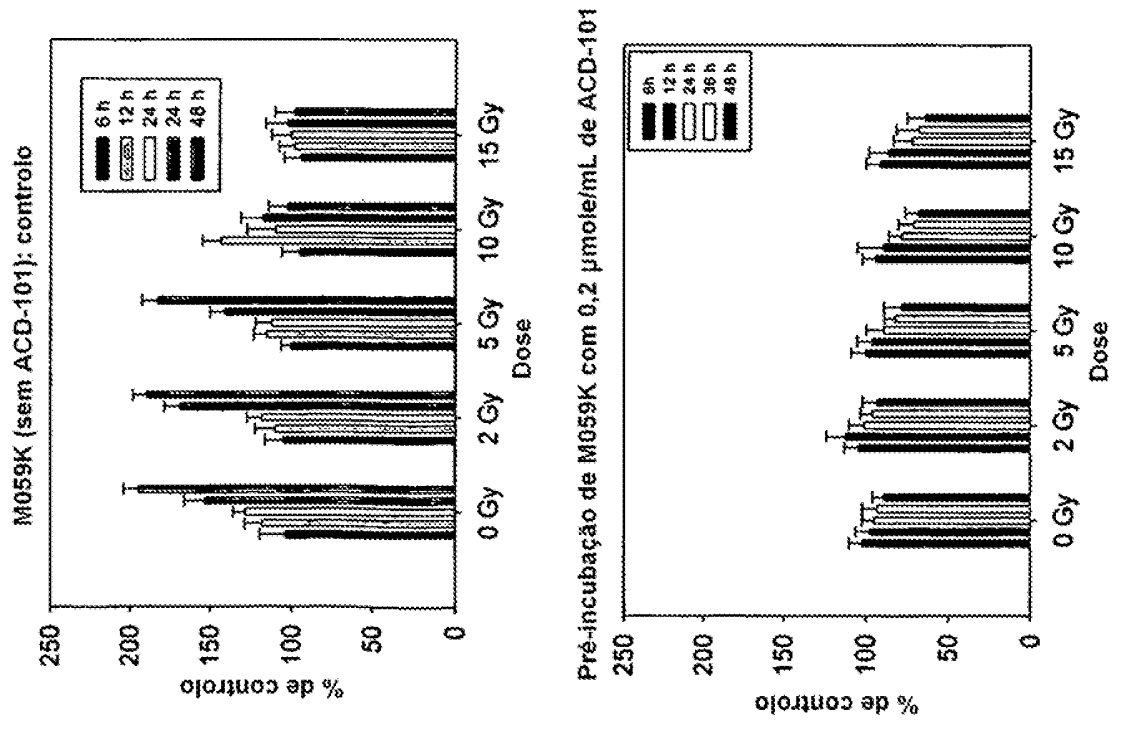
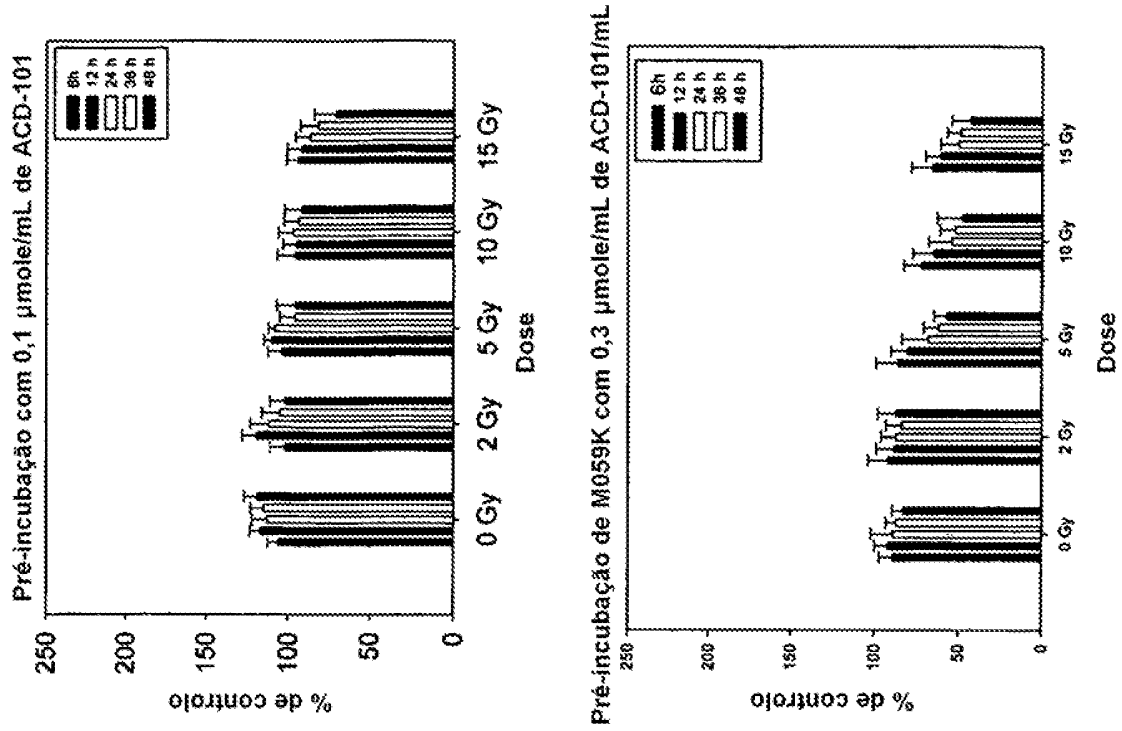


Figura 6



0,3 μmole/mL de ACD-101 + 10 Gy, 36 h



0,1 μmole/mL de ACD-101 + 10 Gy, 36 h de incubação

Figura 7

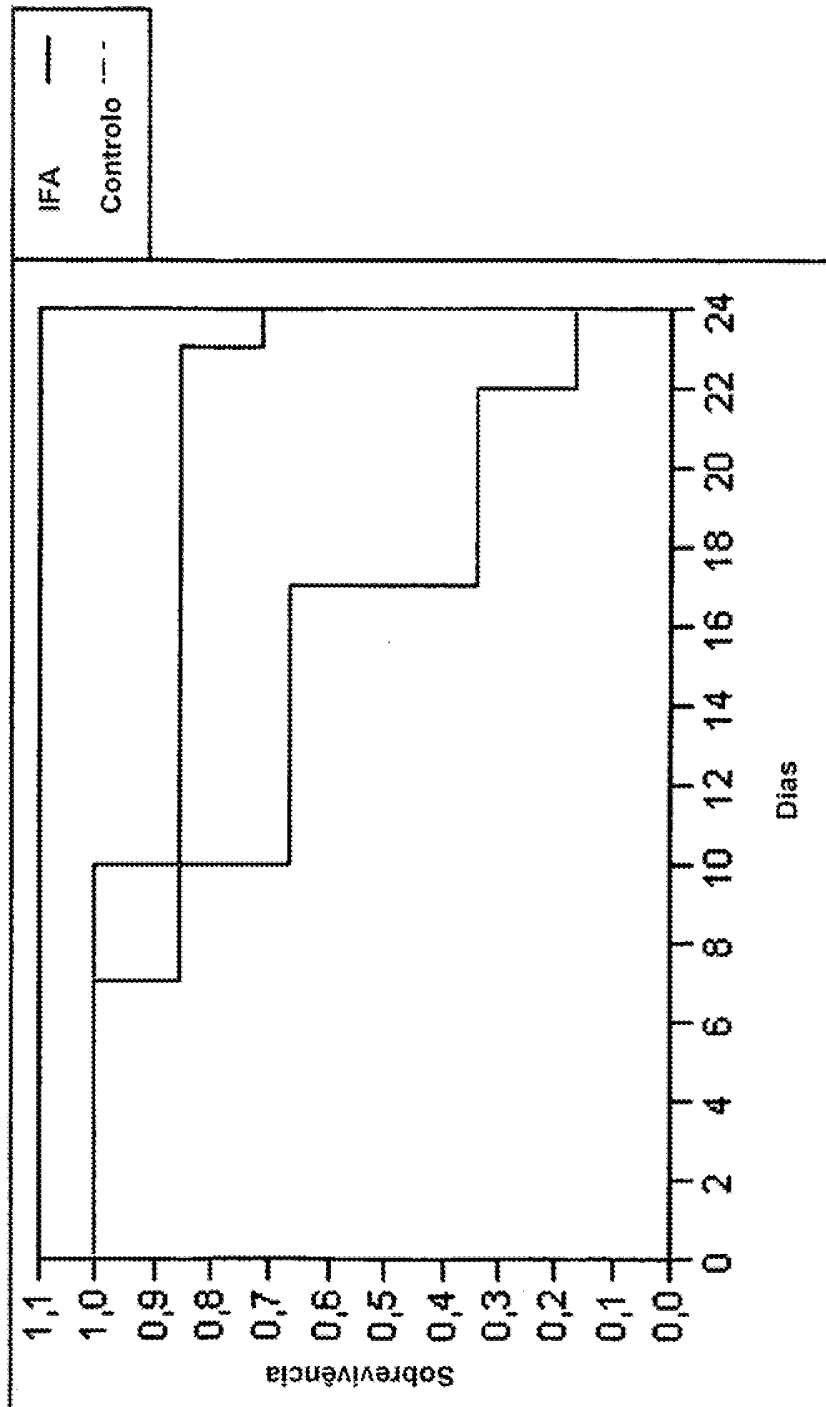


Figura 8