

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.02.25	(73) Titular(es): ASTELLAS PHARMA INC. 3-11, NIHONBASHI-HONCHO 2-CHOME, CHUO-KU TOKYO 1038411 JP
(30) Prioridade(s): 2004.02.25 JP 2004050520 2004.04.29 US 566077 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.11.08	(72) Inventor(es): YOSHINORI NAOE TAKESHI INOUE YASUHIKO KANO JP JP JP
(45) Data e BPI da concessão: 2011.07.13 169/2011	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES SINÉRGICAS COM FK-228**

(57) Resumo:

AGENTE ANTITUMORAL CONTENDO, EM ASSOCIAÇÃO, PELO MENOS UM TIPO DE AGENTE ANTITUMORAL SELECCIONADO DO GRUPO CONSISTINDO NUM AGENTE ANTITUMORAL QUE FORMA UMA LIGAÇÃO CRUZADA COM ADN E APRESENTA UM EFEITO ANTITUMORAL, UM AGENTE ANTITUMORAL ANTIMETABOLITO E UM AGENTE ANTITUMORAL TAXANO, E UM INIBIDOR DE HISTONA DESACETILASE. DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO, PODE SER PROPORCIONADO UM AGENTE ANTITUMORAL QUE CAUSA EFEITOS SECUNDÁRIOS REDUZIDOS E QUE TEM UMA ACTIVIDADE ANTITUMORAL SUPERIOR.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES SINÉRGICAS COM FK-228"

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se à utilização de um inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) definido abaixo em associação com um agente antitumoral seleccionado de um agente antitumoral taxano, um agente antitumoral composto de platina, um agente antitumoral antimetabolito, a um agente antitumoral compreendendo a referida associação e ao referido inibidor de histona desacetilase para utilização no aumento do efeito antitumoral dos referidos agentes antitumorais.

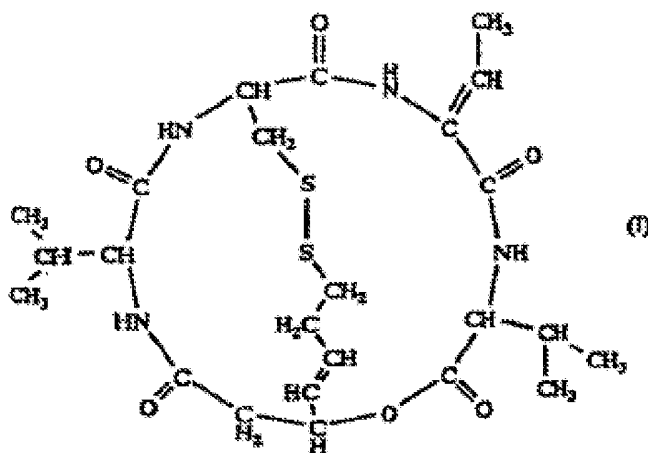
ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Na quimioterapia de tumores, particularmente tumores malignos, em geral, é raro conseguir um efeito antitumoral desejado por administração de um único agente antitumoral, e em situações clínicas, portanto, a terapêutica com fármacos múltiplos utilizando dois ou mais agentes com diferentes mecanismos de acção tem sido utilizada com o objectivo de aumentar o seu efeito. Esta terapêutica de associação visa aliviar os efeitos secundários e aumentar a acção antitumoral por associação de agentes antitumorais tendo diferentes mecanismos de acção, para assim 1) diminuir a população de células insensíveis, 2) evitar ou retardar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, 3) dispersar toxicidade por uma

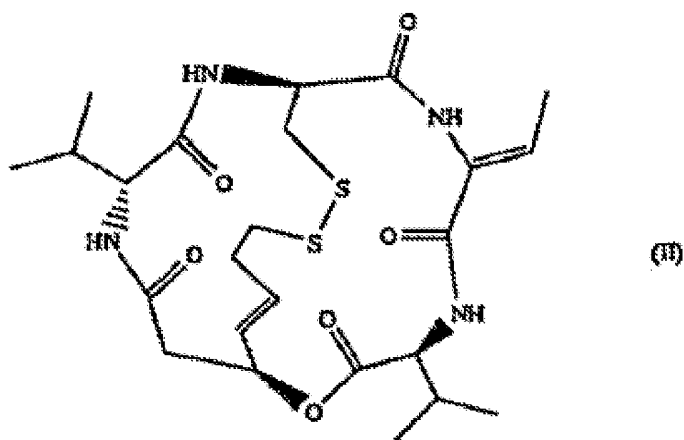
associação de agentes farmacêuticos com toxicidades diferentes e semelhantes. No entanto, as associações aleatórias de agentes farmacêuticos com diferentes mecanismos de acção para uma terapêutica de associação não proporcionam necessariamente, uma acção de aumento do efeito antitumoral ou sinergia.

Foi descrito que os inibidores de histona desacetilase (HDAC) induzem elevada acetilação de histona e, como resultado, induz a actividade reguladora da transcrição em vários genes, a actividade inibidora do ciclo celular e a apoptose. Os inibidores de histona desacetilase também são conhecidos como um agente anticancerígeno potente (ver documento JP-B-7-64872, *Experimental Cell Research*, US (1998), vol. 241, páginas 126-133).

Por exemplo, um composto representado pela fórmula (I)



ou um sal farmacêuticamente aceitável (daqui em diante também referido como composto (I)), particularmente um estereoisómero representado pela fórmula (II)



(daqui em diante também referido como FK228) ou um sal farmacologicamente aceitável são inibidores de histona desacetilase e está descrito mostrarem uma actividade antitumoral potente (ver documento JP-B-7-64872 (correspondente à Patente U.S. N° 4977138), *Experimental Cell Research* (US) (1998), vol. 241, páginas 126-133).

No entanto, a utilização combinada de um composto (I) e de um agente antitumoral que forma uma ligação cruzada com o ADN e apresenta um efeito antitumoral, tal como a cisplatina e semelhantes, um agente antitumoral antimetabolito, tal como 5-fluoro-uracilo e semelhantes ou um agente antitumoral taxano, de que todos são convencionalmente amplamente utilizados como agentes antitumorais, bem como um efeito proporcionado pela utilização combinada, ainda não foram sido descritos.

Budillon E. T., *European Journal of Cancer*, S29, 2002 descreve a utilização combinada do inibidor de HDAC SAHA e 5-fluoro-uracilo para inibição da proliferação de células de cancro colorrectal.

R. Furumai *et al.*, *Cancer Research* 62, 4916-4921, 2002 menciona que a utilização de FK228 em associação com fármacos antitumorais que são inactivados por glutatona pode ser prometedora.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

É, portanto, um objectivo da presente invenção, proporcionar um agente antitumoral compreendendo, em associação, um agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral taxano, um agente antitumoral composto de platina e um agente antitumoral antimetabolito, e um agente farmacêutico de fórmula (I) que aumenta acentuadamente o efeito antitumoral, que reduz os efeitos secundários e apresenta uma actividade antitumoral superior.

Como resultado de estudos intensivos, a presente requerente verificou que o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I), conhecido por ter uma actividade inibidora de histona desacetilase potente, também aumenta extraordinariamente o efeito antitumoral de agentes antitumorais conhecidos: um agente antitumoral do grupo da platina, um agente antitumoral antimetabolito e um agente antitumoral taxano, o que resultou na conclusão da presente invenção. Em conformidade, a presente invenção proporciona a utilização de um composto de fórmula (I) como definido nas reivindicações 1 a 7, um agente antitumoral como definido nas reivindicações 8 a 14, e o referido composto para utilização no aumento do efeito antitumoral de agentes antitumorais específicos como definido nas reivindicações 15 a 28.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig.1 é um gráfico que mostra o conceito da análise.

A Fig. 2 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação (adição simultânea) de FK228 e cisplatina em células DU-145 (Exemplo 1).

A Fig. 3 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação de FK228 e cisplatina (adição contínua pela ordem FK228 → cisplatina) em células DU-145 (Exemplo 2).

A Fig. 4 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação de FK228 e cisplatina (adição contínua pela ordem cisplatina → FK228) em células DU-145 (Exemplo 2).

A Fig. 5 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação (adição simultânea) de FK228 e 5-fluoro-uracilo em células DU-145 (Exemplo 3).

A Fig. 6 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação de FK228 e 5-fluoro-uracilo (adição contínua pela ordem FK228 → 5-fluoro-uracilo) em células DU-145 (Exemplo 4).

A Fig. 7 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação de FK228 e 5-fluoro-uracilo (adição contínua pela ordem 5-fluoro-uracilo → FK228) em células DU-145 (Exemplo 4).

A Fig. 8 é um gráfico que mostra a análise de isobologramas da utilização em associação de FK228 e paclitaxel (adição contínua pela ordem paclitaxel → FK228) em células DU-145 (Exemplo 5).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Os inibidores de histona desacetilase (particularmente o composto (I) e FK228) aumentam de forma notável o efeito antitumoral de um agente antitumoral composto de platina, um agente antitumoral antimetabolito ou um agente antitumoral taxano.

Portanto, o agente antitumoral da presente invenção compreendendo, em associação, pelo menos, um tipo de agente antitumoral seleccionado de um agente antitumoral do grupo da platina, um agente antitumoral antimetabolito e agente antitumoral taxano, e o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) produz um efeito terapêutico superior contra o cancro numa dose mais pequena em comparação com a administração de um único agente antitumoral seleccionados dos referidos agentes antitumorais ou o inibidor de histona desacetilase, e pode suprimir efeitos secundários a um nível mais baixo.

MELHOR FORMA DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

O inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) a ser utilizado na presente invenção é um composto que se liga a um sítio activo da histona desacetilase competitivamente com substratos e/ou apresenta um efeito de diminuir a actividade

enzimática da histona desacetilase ou de inibir, de outra forma, a actividade enzimática e inclui compostos conhecidos como inibidores de histona desacetilase. Para ser mais específico, o composto (I) acima referido, um seu sal e um seu derivado (e. g., composto (I) acetilado, forma de tiol com a ligação S-S reduzida etc., descrita no documento WO 02/06307) são utilizados de acordo com a invenção. Análogos de FK228 estão descritos na Patente US Nº 6403555. O inibidor de histona desacetilase pode ser um composto ou uma mistura de dois ou mais compostos de fórmula (I).

Como o composto inibidor de histona desacetilase, é utilizado o composto de fórmula (I). Embora o composto (I) possa ter um estereoisómero (e. g., FK228) com base num átomo de carbono assimétrico ou numa ligação dupla, tal como uma forma opticamente activa, um isómero geométrico e semelhantes, todos estes isómeros e as suas misturas também estão abrangidos pelo âmbito do composto (I).

Além disso, solvatos (e. g., compostos de inclusão (e. g., hidratos etc.)), formas anidras e outras formas polimórficas ou sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos aqui descritos estão também abrangidos pelo âmbito da presente invenção.

Na descrição da especificação que se segue, salvo se particularmente especificado, uma simples referência a um composto (I) significa um grupo de compostos incluindo FK228 e um sal farmaceuticamente aceitável, independentemente da estereoisomeria.

Os inibidores de histona desacetilase descritos acima são substâncias conhecidas e disponíveis. Por exemplo, o FK228, que

é um dos estereoisômeros do composto (I), pode ser obtido por cultura de uma estirpe pertencente ao género *Chromobacterium*, que é capaz de produzir FK228, sob condições aeróbias e colheita da substância do seu caldo de cultura. Como a estirpe pertencente ao género *Chromobacterium*, que é capaz de produzir FK228, por exemplo, pode ser mencionada a *Chromobacterium violaceum* WB968 (FERM BP-1968). Mais especificamente, o FK228 pode ser obtido de uma estirpe produtora de FK228 como descrito no documento JP-B-7-64872 (correspondente à Patente US N° 4977138). O FK228 é, de um modo preferido, colhido de uma estirpe pertencente ao género *Chromobacterium*, que é capaz de produzir FK228, porque pode ser obtido mais facilmente. O FK228 sintéticos ou semi-sintético também é vantajoso na medida em que não é necessário um passo de purificação adicional ou o número de passos pode ser reduzido. Analogamente, os compostos A, que não o FK228, também podem ser obtidos por semi-síntese ou síntese total por métodos conhecidos convencionais. Para ser mais específico, pode ser produzido de acordo com o método descrito por Khan W. Li et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, 7237-7238 (1996)).

Um sal farmaceuticamente aceitável do composto (I) inclui sais com uma base ou um sal de adição de ácido, tais como sais com base inorgânica (e. g., sais de metais alcalinos tais como sal de sódio, sal de potássio etc., sais de metais alcalino-terrosos, tais como sal de cálcio, sal de magnésio, etc., sal de amónio), sais com uma base orgânica (e. g., sais de aminas orgânicas, tais como sal de trietilamina, sal de diisopropiletilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal trietanolamina, sal de diciclo-hexilamina, sal de N,N'-dibenziletilenodiamina, etc.), sais de adição de ácidos inorgânicos (e. g., cloridrato, bromidrato, sulfato, fosfato,

etc.), sais de adição de ácidos carboxílicos orgânicos ou de adição ácidos sulfônicos (e. g., formato, acetato, trifluoroacetato, maleato, tartarato, fumarato, metanossulfonato, benzenossulfonato, toluenossulfonato, etc.), sais com um aminoácido básico ou ácido (e. g., arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, etc.) e semelhantes.

Os agentes antitumorais compostos de platina conhecidos são adequados de acordo com a invenção. Exemplos específicos destes incluem cisplatina, carboplatina e semelhantes para o agente antitumoral composto de platina. Estes compostos podem ser utilizados com um tipo de composto, ou dois ou mais tipos de compostos numa mistura.

O agente antitumoral antimetabolito a ser utilizado na presente invenção pode ser qualquer antimetabolito conhecido como um agente antitumoral. Exemplos específicos incluem 5-fluoro-uracilo, tegafur e semelhantes. O agente antitumoral antimetabolito pode ser um tipo de composto ou dois ou mais tipos de compostos numa mistura.

O agente antitumoral taxano utilizado na presente invenção inclui vários componentes ou produtos semi-sintéticos seus tendo, na estrutura, um esqueleto de taxano isolado de *Taxus brevifolia* ou produtos sintéticos puros tendo um esqueleto de taxano. Especificamente, podem ser mencionados paclitaxel, docetaxel e semelhantes. O agente antitumoral taxano pode ser um tipo de composto ou dois ou mais tipos de compostos numa mistura.

Na presente invenção, o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) aumenta consideravelmente, pelo menos, um tipo de

agente antitumoral seleccionado de um agente antitumoral do grupo da platina, um agente antitumoral antimetabolito e um agente antitumoral taxano. Portanto, o agente antitumoral e o intensificador do efeito antitumoral da presente invenção são úteis como agentes terapêuticos para doenças cancerígenas, incluindo cancro do sangue, tumores sólidos, etc.; mais especificamente, cancro do pulmão, linfoma maligno (e. g., reticulossarcoma, linfossarcoma, doença de Hodgkin, etc.), cancro do aparelho digestivo (e. g., cancro gástrico, cancro da vesícula biliar, cancro do canal biliar, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do cólon, cancro rectal, etc.), cancro da mama, cancro do ovário, sarcoma músculo-esquelético (e. g., osteossarcoma, etc.), cancro da bexiga, leucemia (e. g., leucemia aguda incluindo crise blástica de leucemia mielóide crónica, etc.), cancro do rim, cancro da próstata e semelhantes.

O pelo menos um tipo de agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral do grupo da platina, um agente antitumoral antimetabolito e um agente antitumoral taxano pode ser um tipo de composto ou dois ou mais compostos administrados separadamente ou numa mistura.

Na presente especificação, salvo se particularmente especificado, por "agente antitumoral A" entende-se "pelo menos um tipo de agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral do grupo da platina, um agente antitumoral antimetabolito e um agente antitumoral taxano".

O agente antitumoral ou composições farmacêuticas da presente invenção compreende um inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A em associação (*i. e.*, agente concomitante) e pode ser qualquer, desde que possa

compreender um inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A quando em utilização para administração. O agente antitumoral da presente invenção pode ser uma preparação única obtida por preparação simultaneamente do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A, ou uma associação de, pelo menos, duas preparações obtidas preparando separadamente um inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A.

O modo de administração não está particularmente limitado, e, por exemplo, pode mencionar-se (1) a administração de uma composição contendo um inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A, nomeadamente, administração de uma única preparação, (2) a administração simultânea de duas preparações pela mesma via de administração, que são obtidas por preparação separadamente do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A, (3) a administração interpolada de duas preparações pela mesma via de administração, que são obtidas por preparação separadamente do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A (e. g., administração pela ordem de um inibidor de histona desacetilase e um agente antitumoral A, ou a sua administração por ordem inversa), (4) a administração simultânea de duas preparações por diferentes vias de administração, que são obtidas por preparação separadamente do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A, (5) a administração interpolada de duas preparações por diferentes vias de administração, que são obtidas por preparação separadamente do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A (e. g., administração pela ordem do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A, ou a sua administração

por ordem inversa) e semelhantes podem ser mencionados.

O inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) é, de acordo com a invenção, para utilização na intensificação do efeito antitumoral de, pelo menos, um agente antitumoral A concomitante. No que se segue, esta forma de realização é designada "intensificador". Em conformidade, quando que o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) está contido, o intensificador pode conter um agente antitumoral A numa única preparação e mesmo que não contenha um agente antitumoral A, um agente antitumoral A pode ser administrado separadamente como um agente concomitante.

O modo de administração não está particularmente limitado e, por exemplo, pode mencionar-se (1) a administração do intensificador da presente invenção contendo o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e um agente antitumoral A numa única preparação, (2) a administração simultânea do intensificador e de um agente antitumoral A pela mesma via de administração, (3) a administração interpolada do intensificador e de um agente antitumoral A pela mesma via de administração (e. g., administração pela ordem de um agente antitumoral A e o intensificador da presente invenção ou a sua administração por ordem inversa), (4) a administração simultânea do intensificador e de um agente antitumoral A por diferentes vias de administração, (5) a administração interpolada do intensificador e de um agente antitumoral A por diferentes vias de administração (e. g., administração pela de um agente antitumoral A e o intensificador da presente invenção, ou a sua administração por ordem inversa) e outras semelhantes.

Na presente invenção, a proporção de mistura do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e do agente antitumoral A pode estar, quer sejam formulados numa única preparação ou em preparações separadas, na gama de, geralmente, 1:100-100:1, de um modo preferido, 1:10-10:1, em proporção em peso.

Quando um agente antitumoral A se destina a ser formulado numa mistura de dois ou mais tipos seus, a proporção de mistura não está particularmente limitada. Quando se pretende preparar uma mistura de um agente antitumoral do grupo da platina ou um agente antitumoral alquilante e um agente antitumoral antimetabolito, a proporção de mistura (proporção em peso) está, de um modo preferido, na gama de 1:100-100:1; quando se pretende preparar uma mistura de um agente antitumoral do grupo da platina ou um agente antitumoral alquilante e um agente antitumoral taxano, a proporção de mistura (proporção em peso) está, de um modo preferido, na gama de 1:100-100:1; e quando se pretende preparar uma mistura de um agente antitumoral antimetabolito e um agente antitumoral taxano, a proporção de mistura (proporção em peso) está, de um modo preferido, na gama de 1:100-100:1.

Também é preferido administrar o agente concomitantemente com ATRA (ácido retinóico todo-trans) (e. g., a administração como um agente combinado, administração simultânea ou separada como preparações individuais), com o objectivo de intensificar o efeito antitumoral da presente invenção.

As composições farmacêuticas, agente antitumoral A e/ou inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) da presente invenção podem ser utilizadas na forma de uma preparação farmacêutica, tal como um sólido, semi-sólido ou líquido

(comprimido, pastilha, trocisco, cápsula, supositório, creme, pomada, aerossol, pó, líquido, emulsão, suspensão, xarope, injeção, etc.) contendo o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e/ou um agente antitumoral A como ingrediente(s) activo(s), que é adequada para administração transrectal, intranasal, pulmonar, vaginal, externa (tópica), oral ou parentérica (incluindo administração subcutânea, por implantação, intravenosa e intramuscular).

O intensificador do efeito antitumoral pode ser utilizado na forma de uma preparação farmacêutica, tal como um sólido, semi-sólido ou líquido (comprimido, pastilha, trocisco, cápsula, supositório, creme, pomada, aerossol, pó, líquido, emulsão, suspensão, xarope, injeção, etc.) contendo o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) como um ingrediente activo, que é adequada para administração transrectal, intranasal, pulmonar, vaginal, externa (tópica), oral ou parentérica (incluindo administração subcutânea, por implantação, intravenosa e intramuscular).

O agente antitumoral e o intensificador do efeito antitumoral também pode ser produzido por métodos convencionais utilizando vários transportadores orgânicos ou inorgânicos utilizados convencionalmente para a formação de preparações farmacêuticas, tais como excipientes (e. g., sacarose, amido, manitol, sorbitol, lactose, glucose, celulose, talco, fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, etc.), agentes de condensação (e. g., celulose, metil celulose, hidroxipropilcelulose, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábica, polietileno glicol, sacarose, amido, etc.), desintegrantes (e. g., amido, carboximetilcelulose, sal de cálcio da carboximetil celulose, hidroxipropilamido, carboxi metil amido de sódio, hidrogeno

carbonato de sódio, fosfato de cálcio, citrato de cálcio, etc.), lubrificantes (e. g., estearato de magnésio, aerosil, talco, lauril sulfato de sódio, etc.), correctivos (e. g., ácido cítrico, mentol, glicina, laranja em pó, etc.), conservantes (e. g., benzoato de sódio, hidrogeno sulfito de sódio, metilparabeno, propilparabeno, etc.), estabilizadores (ácido cítrico, citrato de sódio, ácido acético, etc.), agentes de suspensão (e. g., metil celulose, polivinilpirrolidona, estearato de alumínio, etc.), dispersantes (e. g., hidroxipropilmetil celulose, etc.), diluentes (e. g., água, etc.), materiais à base de cera (e. g., manteiga de cacau, polietileno glicol, vaselina branca, etc.) e semelhantes.

O agente antitumoral e o intensificador do efeito antitumoral podem ser administrados a mamíferos, incluindo humanos, na forma das preparações farmacêuticas convencionais acima referidas sem qualquer limitação específica. Em particular, é preferida a administração intravenosa, intramuscular ou oral.

A dose na presente invenção pode ser ajustado para um nível mais baixo do que para a administração separada de cada um do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e o agente antitumoral A.

Por exemplo, a dose é apropriadamente determinada de acordo com vários factores, tais como o peso corporal e/ou idade dos doentes e/ou gravidade da doença e via de administração.

Por exemplo, quando o composto (I) é utilizado como um inibidor de histona desacetilase e a cisplatina é utilizada como um agente antitumoral A, a dose diária do composto (I) e

cisplatina em associação no caso de uma administração intravenosa é geralmente 1-1000 mg, de um modo preferido, 5-100 mg, de um modo mais preferido, 10-60 mg, por 1 m² da área superficial do corpo humano, que é administrada para o tratamento por perfusão contínua. Neste caso, a dose diária de composto (I) é 0,1-100 mg, de um modo preferido, 1-50 mg, de um modo mais preferido, 5-30 mg, na quantidade de composto (I), por 1 m² da área superficial do corpo humano e a cisplatina é administrada na dose de [dose acima de uma associação de composto (I) e cisplatina - dose do composto (I)].

EXEMPLOS

Os resultados dos ensaios farmacológicos que mostram a utilidade da presente invenção são apresentados a seguir.

Utilizando o FK228 como um inibidor de histona desacetilase, cisplatina (CDDP) como um agente antitumoral, 5-fluoro-uracilo (5-FU) como um agente antitumoral antimetabolito e paclitaxel como um agente antitumoral taxano, foi avaliado o efeito da utilização em associação do inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) e cada um dos agentes antitumorais. Para o ensaio de avaliação, células de cancro da próstata humanas DU-145 (obtidas de ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION)) foram cultivadas em meio de Eagle modificado de Dulbecco contendo 10% de soro fetal bovino e aplicadas no ensaio.

Exemplo Experimental 1: Efeito da utilização em associação (adição simultânea) de FK228 e cisplatina

Células de cancro da próstata (6×10^3 células/poço) foram cultivadas numa placa com 96 poços durante 24 horas e FK228 (0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM e 50 nM), cisplatina (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM e 5000 nM) ou ambos os agentes farmacêuticos (adição simultânea da associação nas concentrações acima referidas) foi/foram adicionados para atingir várias concentrações. Após cultura durante 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS (-) (soro fisiológico tamponado com fosfato (isento de cálcio e magnésio)) contendo 1% de FBS (soro fetal bovino). O meio foi mudado para um meio isento de fármacos e as células foram cultivadas durante mais 96 h. O FK228 foi dissolvido em etanol e diluído com um meio antes da utilização e a cisplatina foi diluída com um meio antes da utilização.

A actividade antitumoral após cada tratamento foi avaliada pelo ensaio de MTT. Para ser mais específico, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazónio (MTT) foi dissolvido em PBS na concentração de 2,5 mg/mL, sendo 20 µL do mesmo adicionados a cada poço e cultivados durante 4 horas. Formazan formado por células vivas foi dissolvido pela adição de isopropanol ácido (100 µL) e a absorvência de cada poço foi medida a um comprimento de onda de 580 nm.

Com a absorvência (OD) de células não tratadas como 100%, obteve-se curvas de resposta à concentração de actividade antitumoral de um agente farmacêutico individual e de uma associação de agentes farmacêuticos.

O efeito da utilização em associação de FK228 e cisplatina foi avaliado através da análise de isobologramas de acordo com o método de Steel *et al.* (*Int. J. Biol. Phys. Radiat. Oncol.*, 5: 85-91, 1979). Nomeadamente, com base na curva de reacção à concentração de cada agente farmacêutico individual, 80% da concentração inibidora do crescimento (IC₈₀) pela utilização em associação era determinada teoricamente e mostrado por curvas num gráfico. A concentração de um agente farmacêutico que obteve IC₈₀ numa utilização em associação real foi traçada num gráfico (ver Fig. 1). Quando o gráfico estava numa área (b) rodeada pelas curvas, determinou-se que estava presente um efeito aditivo, quando estava numa área (a) mais perto do ponto de origem, determinou-se que estava presente um efeito sinérgico, e quando estava numa área (c) mais distante do ponto de origem, determinou-se que estava presente um efeito antagonista. Foram utilizados valores relativos em que a IC₈₀ de um agente individual era 1.

O isoblograma do Exemplo Experimental 1 está ilustrado na Fig. 2. Como resultado da utilização em associação (adição simultânea) de FK228 e cisplatina, a actividade antitumoral foi notavelmente melhorada.

Exemplo Experimental 2: Efeito da utilização em associação (adição contínua) de FK228 e cisplatina

Células de cancro da próstata (6×10^3 células/poço) foram cultivadas numa placa com 96 poços durante 24 horas e FK228 (0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM e 50 nM)

e cisplatina (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM e 5000 nM) foram adicionados para atingir várias concentrações. Após cultura durante 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS(-) contendo 1% de FBS.

Após a lavagem, o FK228 e a cisplatina foram adicionados pela adição contínua de ambos os fármacos em associação (adicionados pela ordem FK228 $\Rightarrow$ cisplatina ou cisplatina $\Rightarrow$ FK228 para obter a combinação de cada concentração). A mistura foi adicionalmente cultivada durante 24 horas e lavada duas vezes com PBS(-) contendo 1% de FBS. O meio foi mudado para um meio isento de fármacos e as células foram cultivadas durante mais 72 horas. O efeito da utilização em associação foi avaliado por um método semelhante ao do Exemplo Experimental 1.

O isobolograma do Exemplo Experimental 2 está apresentado na Fig. 3 (ordem de adição FK228 $\Rightarrow$ cisplatina) e na Fig. 4 (ordem de adição cisplatina $\Rightarrow$ FK228). Uma intensificação notável da actividade antitumoral foi proporcionada pela utilização em associação (adição contínua) de FK228 e cisplatina em qualquer ordem de adição (ordem de adição FK228 $\Rightarrow$ cisplatina ou cisplatina $\Rightarrow$ FK228).

Exemplo Experimental 3: Efeito da utilização em associação (adição simultânea) de FK228 e 5-fluoro-uracilo

Do mesmo modo que no Exemplo Experimental 1, excepto que se adicionou várias concentrações de 5-fluoro-uracilo (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 500 μ M) em vez de cisplatina, avaliou-se o efeito da utilização em associação. O

5-fluoro-uracilo foi diluído com um meio antes da adição.

O isobolograma do Exemplo Experimental 3 está apresentado na Fig. 5. A utilização em associação (adição simultânea) de FK228 e 5-fluoro-uracilo aumentou a actividade antitumoral.

Exemplo Experimental 4: Efeito da utilização em associação (adição contínua) de FK228 e 5-fluoro-uracilo

Do mesmo modo que no Exemplo Experimental 2, excepto que se adicionou várias concentrações de 5-fluoro-uracilo (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 500 μ M para a ordem de adição 5-fluoro-uracilo $\Rightarrow$ FK228; e 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M, 5000 μ M e 10000 μ M para a ordem de adição FK228 $\Rightarrow$ 5-fluoro-uracilo) em vez de cisplatina, avaliou-se o efeito da utilização em associação. O 5-fluoro-uracilo foi diluído com um meio antes da adição.

O isobolograma do Exemplo Experimental 4 está apresentado na Fig. 6 (ordem de adição FK228 $\Rightarrow$ 5-fluoro-uracilo) e Fig. 7 (ordem de adição 5-fluoro-uracilo $\Rightarrow$ FK228). A utilização em associação (adição contínua) de FK228 e 5-fluoro-uracilo para qualquer ordem de adição (ordem de adição FK228 $\Rightarrow$ 5-fluoro-uracilo ou 5-fluoro-uracilo $\Rightarrow$ FK228) aumentou a actividade antitumoral.

Exemplo Experimental 5: Efeito da utilização em associação de FK228 e paclitaxel (adição contínua pela ordem paclitaxel $\Rightarrow$ FK228)

Da mesma forma como no Exemplo Experimental 2, excepto que se adicionou várias concentrações de paclitaxel (0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM e 20 nM) pela ordem paclitaxel $\Rightarrow$ FK228 em vez de cisplatina, foi avaliado o efeito da utilização em associação. O paclitaxel foi dissolvido em etanol e diluído com um meio antes da adição.

O isobolograma do Exemplo Experimental 5 está apresentado na Fig. 8. A utilização em associação de FK228 e paclitaxel (adição contínua pela ordem paclitaxel $\Rightarrow$ FK228) aumentou a actividade antitumoral.

Exemplo de Formulação 1

FK228	20 mg
etanol	20 mL

FK228 (20 mg) é dissolvido em e diluído com etanol (20 mL) para dar uma preparação para injeção.

Exemplo de Formulação 2

FK228	20 mg
cisplatina	100 mg
soro fisiológico	100 mL

FK228 (20 mg) e cisplatina (100 mg) são dissolvidos e diluídos com soro fisiológica (100 mL) para dar uma preparação para injeção.

Exemplo de Formulação 3

FK228	20 mg
5-fluoro-uracilo	500 mg
etanol	100 mL

FK228 (20 mg) e 5-fluoro-uracilo (500 mg) são dissolvidos em e diluídos com etanol (100 mL) para dar uma preparação para injeção.

Exemplo de Formulação 4

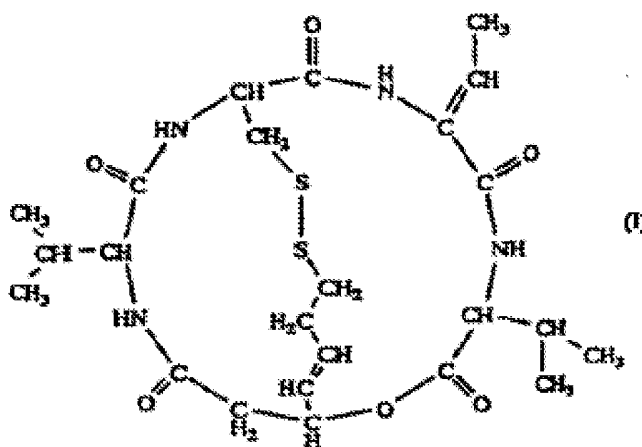
FK228	20 mg
Paclitaxel	20 mg
5 etanol	40 mL

FK228 (20 mg) e paclitaxel (20 mg) são dissolvidos em e diluídos com etanol (40 mL) para dar uma preparação para injeção.

Lisboa, 26 de Agosto de 2011

REIVINDICAÇÕES

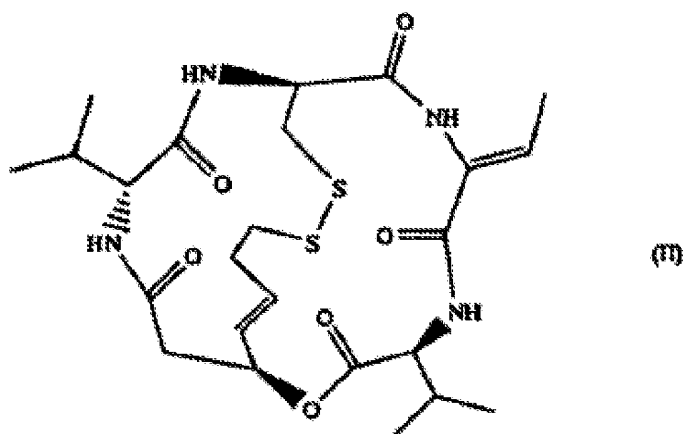
1. Utilização de um inibidor de histona desacetilase em associação com, pelo menos, um agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral taxano, um agente antitumoral composto de platina e um agente antitumoral antimetabolito, em que o inibidor de histona desacetilase é o composto representado pela fórmula (I) seguinte,



ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, para o fabrico de um agente antitumoral.

2. Utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que o agente antitumoral composto de platina é, pelo menos, um de cisplatina e carboplatina.
3. Utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que o agente antitumoral antimetabolito é, pelo menos, um seleccionado de 5-fluoro-uracilo e tegafur.

4. Utilização como reivindicado na reivindicação 1 ou 3, em que o agente antitumoral antimetabolito é 5-fluoro-uracilo.
5. Utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que o agente antitumoral taxano é, pelo menos, um de paclitaxel e docetaxel.
6. Utilização como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 5, em que o agente antitumoral é um agente antitumoral para o cancro do pulmão, linfoma maligno, cancro do aparelho digestivo, cancro da mama, cancro do ovário, sarcoma músculo-esquelético, cancro da bexiga, leucemia, cancro do rim ou cancro da próstata.
7. Utilização como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 6, em que o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) é o estereoisómero FK228 ilustrado na fórmula (II)



8. Agente antitumoral compreendendo, em associação, pelo menos um tipo de agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral taxano, um agente

antitumoral composto de platina e um agente antitumoral antimetabolito, e um inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

9. Agente antitumoral como reivindicado na reivindicação 8, em que o agente antitumoral composto de platina é, pelo menos, um de cisplatina e carboplatina.
10. Agente antitumoral como reivindicado na reivindicação 8, em que o agente antitumoral antimetabolito é seleccionado de 5-fluoro-uracilo e tegaful.
11. Agente antitumoral como definido na reivindicação 8 ou 10, em que o agente antitumoral antimetabolito é 5-fluoro-uracilo.
12. Agente antitumoral como reivindicado na reivindicação 8, em que o agente antitumoral taxano é, pelo menos, um de paclitaxel e docetaxel.
13. Agente antitumoral como reivindicado em qualquer das reivindicações 8 a 12, que é um agente antitumoral para o cancro do pulmão, linfoma maligno, cancro do aparelho digestivo, cancro da mama, cancro do ovário, sarcoma músculo-esquelético, cancro da bexiga, leucemia, cancro do rim ou cancro da próstata.
14. Agente antitumoral como reivindicado em qualquer das reivindicações 8 a 13, em que o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) é o estereoisómero FK228 ilustrado na fórmula (II).

15. Inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) ou um seu sal farmacologicamente aceitável para utilização na intensificação do efeito antitumoral de, pelo menos, um tipo de agente antitumoral concomitante seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral taxano, um agente antitumoral composto de platina e um agente antitumoral antimetabolito.
16. Inibidor de histona desacetilase para utilização de acordo com a reivindicação 15, em que o agente antitumoral composto de platina é, pelo menos, um de cisplatina e carboplatina.
17. Inibidor de histona desacetilase para utilização de acordo com a reivindicação 15, em que o agente antitumoral antimetabolito é seleccionado de, pelo menos, 5-fluoro-uracilo e tegafur.
18. Inibidor de histona desacetilase para utilização de acordo com a reivindicação 15 ou 17, em que o agente antitumoral antimetabolito é 5-fluoro-uracilo.
19. Inibidor de histona desacetilase para utilização de acordo com a reivindicação 15, em que o agente antitumoral taxano é, pelo menos, um de paclitaxel e docetaxel.
20. Inibidor de histona desacetilase para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 15 a 19, em que o tumor tratado é seleccionado de cancro do pulmão, linfoma maligno, cancro do aparelho digestivo, cancro da mama, cancro do ovário, sarcoma músculo-esquelético, cancro da bexiga, leucemia, cancro do rim ou cancro da próstata.

21. Inibidor de histona desacetilase para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 15 a 20, em que o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) é o estereoisómero FK228 ilustrado na fórmula (II).
22. Inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação, terapêutica essa que compreende a utilização de, pelo menos, um tipo de agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral taxano, um agente antitumoral composto de platina e um agente antitumoral antimetabolito.
23. Inibidor de histona desacetilase para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação como reivindicado na reivindicação 22, em que o agente antitumoral composto de platina é, pelo menos, um de cisplatina e carboplatina.
24. Inibidor de histona desacetilase para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação como reivindicado na reivindicação 22, em que o agente antitumoral antimetabolito é seleccionado de, pelo menos, 5-fluoro-uracilo e tegaful.
25. Inibidor de histona desacetilase para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação como reivindicado na reivindicação 22 ou 24, em que o agente antitumoral antimetabolito é 5-fluoro-uracilo.

26. Inibidor de histona desacetilase para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação como reivindicado na reivindicação 22, em que o agente antitumoral taxano é, pelo menos, um de paclitaxel e docetaxel.
27. Inibidor de histona desacetilase para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação de qualquer das reivindicações 22 a 26, para utilização na intensificação do efeito de, pelo menos, um dos agentes antitumorais descritos em qualquer das reivindicações 22 a 26, em que o tumor tratado é seleccionado de cancro do pulmão, linfoma maligno, cancro do aparelho digestivo, cancro da mama, cancro do ovário, sarcoma músculo-esquelético, cancro da bexiga, leucemia, cancro do rim ou cancro da próstata.
28. Inibidor de histona desacetilase para utilização no tratamento de cancro em terapêutica de associação como reivindicado em qualquer das reivindicações 22 a 26, em que o inibidor de histona desacetilase de fórmula (I) é o estereoisómero FK228 ilustrado na fórmula (II).

Lisboa, 26 de Agosto de 2011

FIG. 1

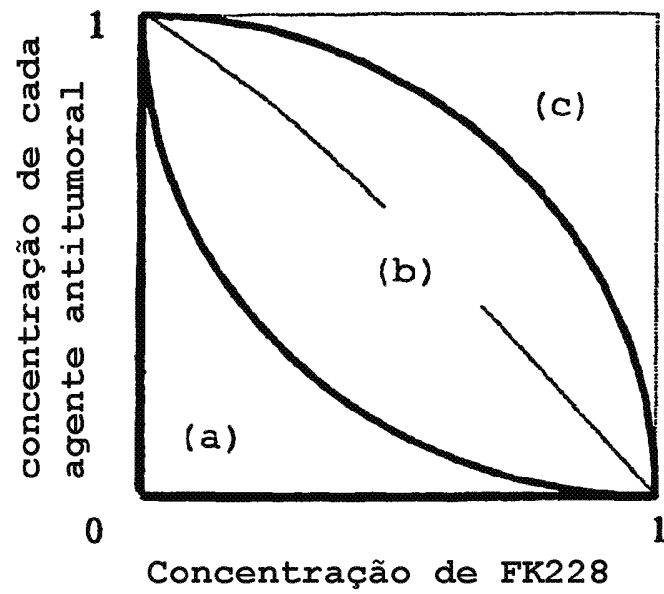


FIG. 2

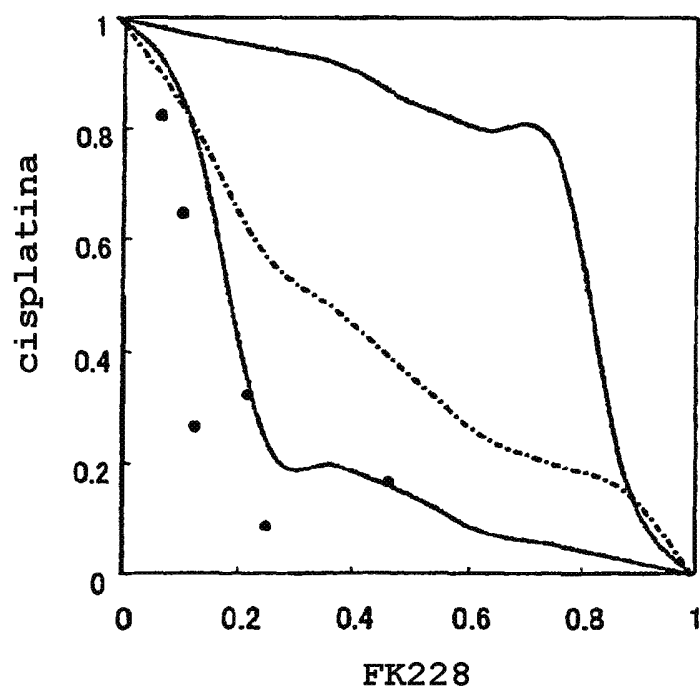


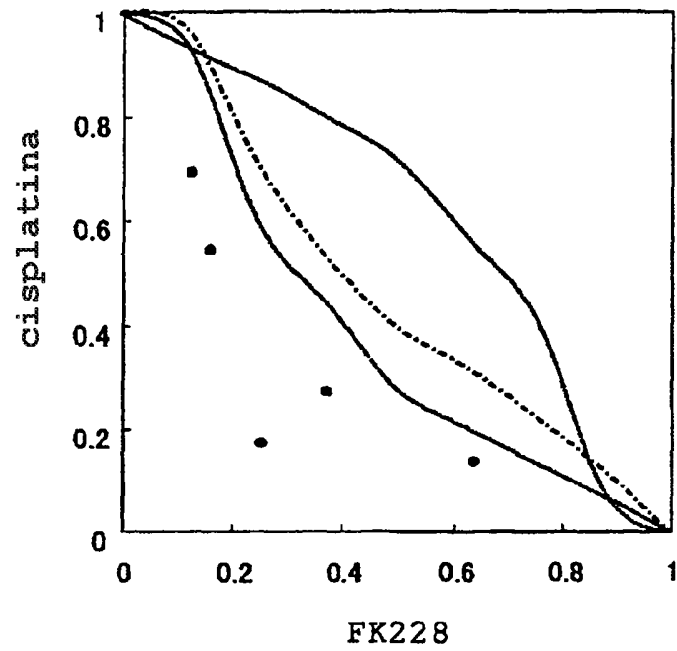
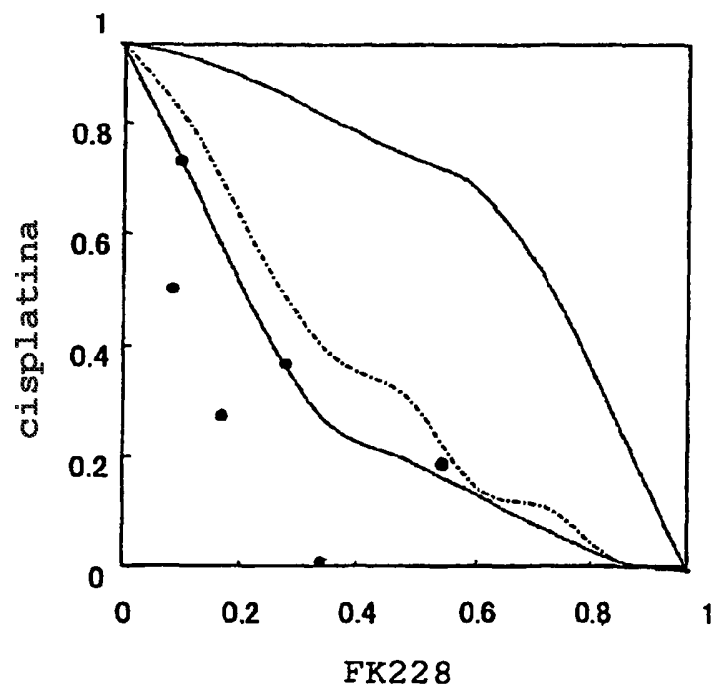
FIG. 3**FIG. 4**

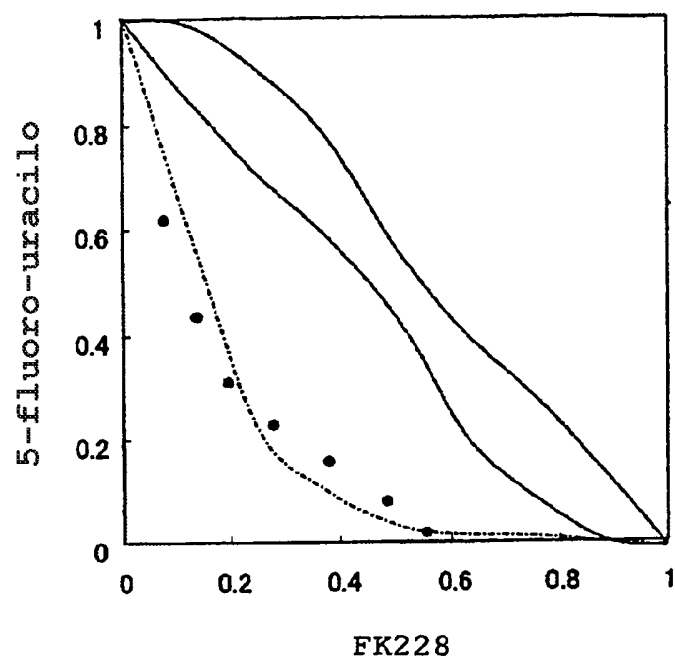
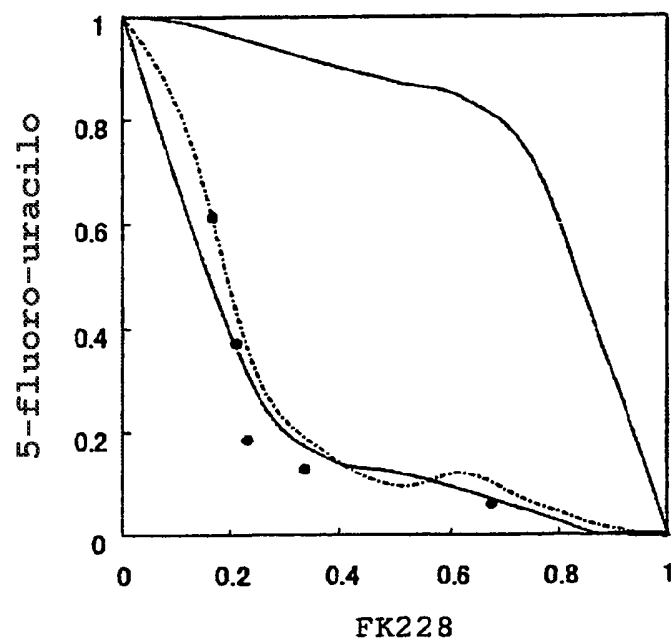
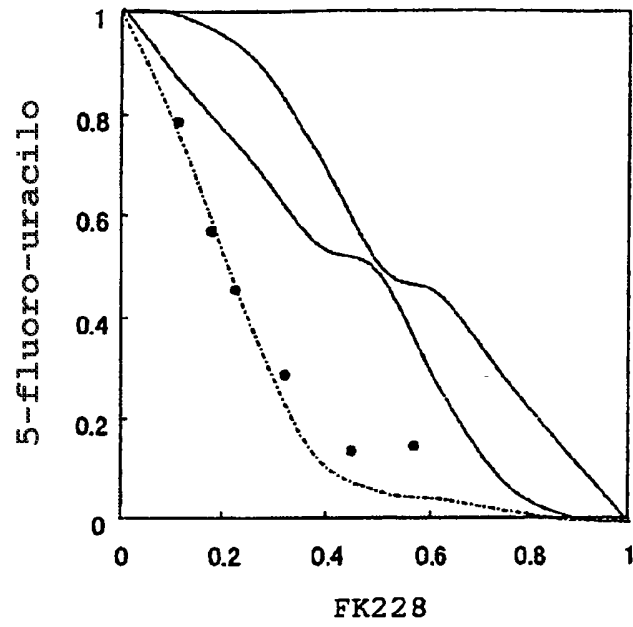
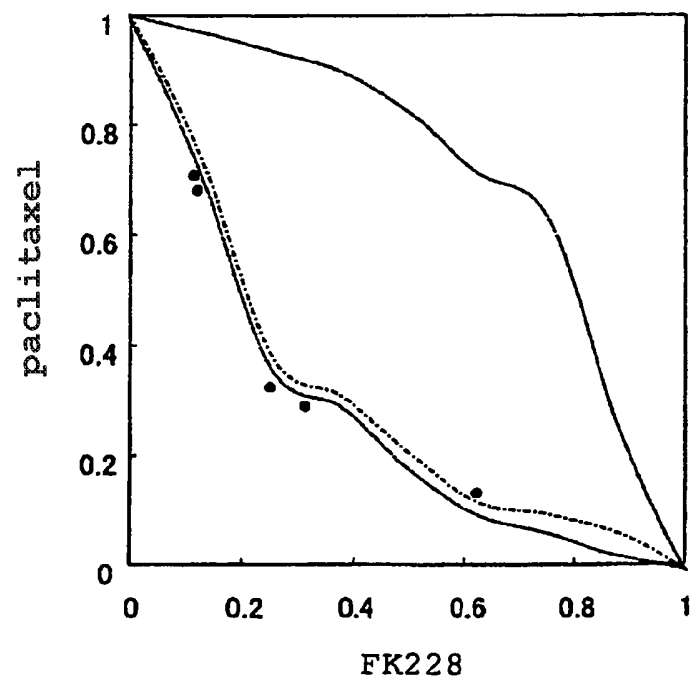
FIG. 5**FIG. 6**

FIG. 7**FIG. 8**

RESUMO

"COMPOSIÇÕES SINÉRGICAS COM FK-228"

Agente antitumoral contendo, em associação, pelo menos um tipo de agente antitumoral seleccionado do grupo consistindo num agente antitumoral que forma uma ligação cruzada com ADN e apresenta um efeito antitumoral, um agente antitumoral antimetabolito e um agente antitumoral taxano, e um inibidor de histona desacetilase. De acordo com a presente invenção, pode ser proporcionado um agente antitumoral que causa efeitos secundários reduzidos e que tem uma actividade antitumoral superior.