

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.11.06	(73) Titular(es): PHARMA MAR, S.A. CALLE DE LA CALERA 3, POLIGONO INDUSTRIAL DE TRES CANTOS 28760 TRES CANTOS, MADRID ES
(30) Prioridade(s): 2000.11.06 US 246233 P 2000.11.13 US 248095 P 2001.10.19 US 345982 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.12.03	(72) Inventor(es): STEVE WEITMAN US NAOTO TAKAHASHI US MAURIZIO D'INCALCI IT GLYNN THOMAS FAICLOTH US RAFAELLA GIAVAZZI IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.01.19 069/2011	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO ANTITUMORAL CONTENDO
ECTEINASCIDINA 743**

(57) Resumo:
A ET-743 É UTILIZADA NA PREPARAÇÃO DE UM MEDI-CAMENTO PARA UM TRATAMENTO
EFFECTIVO DE UM TUMOR ATRAVÉS DE TERAPIA DE COMBINAÇÃO EMPREGANDO ET-743 COM
OUTRO FÁRMACO.

RESUMO

**"COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO ANTITUMORAL CONTENDO
ECTEINASCIDINA 743"**

A ET-743 é utilizada na preparação de um medicamento para um tratamento efectivo de um tumor através de terapia de combinação empregando ET-743 com outro fármaco.

DESCRIÇÃO

**"COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO ANTITUMORAL CONTENDO
ECTEINASCIDINA 743"**

A presente invenção relaciona-se com tratamentos anti-tumor efectivos.

A ecteinascidina 743, ET743, é um agente anti-cancro derivado a partir de uma fonte marinha.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O leitor é remetido para a W00069441 publicada a 23 de Novembro de 2000 para informação sobre composições e utilizações de ET743 para tratar cancro que sejam consideradas em conformidade com o Art. 54(3)EPC.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto desta invenção, nós providenciamos terapias de combinação efectivas baseadas em ecteinascidina 743, utilizando outros fármacos.

O objecto da invenção é definido nas reivindicações.

FOMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Os outros fármacos poderão formar parte da mesma composição, ou serem providenciados como uma composição separada para administração ao mesmo tempo ou numa altura diferente. A identidade do outro fármaco não está particularmente limitada, e os candidatos adequados incluem:

- a) fármacos com efeitos antimitóticos, especialmente aqueles que possuem como alvo os elementos citoesqueléticos, incluindo moduladores microtubulares tais como fármacos taxano (tais como taxol, paclitaxel, taxotere, docetaxel), podofilotoxinas ou alcalóides vinca (vincristina, vinblastina);
- b) fármacos anti-metabolito tais como 5-fluorouracil citarabina, gemcitabina, análogos de purina tais como pentostatina, metotrexato);
- c) agentes alquilantes tais como mostardas de azoto (tais como ciclofosfamida ou ifosfamida);
- d) fármacos que possuem como alvo o ADN tais como os fármacos de antraciclina adriamicina, doxorubicina, farmorubicina ou epirubicina;
- e) fármacos que possuem como alvo as topoisomerasas tais como etoposido;
- f) hormonas e agonistas ou antagonistas de hormonas tais como estrógenos, anti-estrógenos (tamoxifeno e compostos relacionados) e andrógenos, flutamida, leuprorelina, goserelina, ciprotrone ou octreotide;
- g) fármacos que possuem como alvo a transdução de sinal

em células tumorais incluindo derivados de anticorpos tais como herceptina;

h) fármacos alquilantes tais como fármacos de platina (*cis-platina*, *carboplatina*, *oxaliplatina*, *paraplatina*) ou nitrosoureas;

i) fármacos que afectam potencialmente a metástase de tumores tais como inibidores de metaloproteinase de matriz;

j) terapia genética e agentes anti-sensoriais;

k) terapêuticos de anticorpo;

l) outros compostos bioactivos de origem marinha, notavelmente as didemninas tais como a aplidina;

m) análogos esteróides, em particular dexametasona;

n) fármacos anti-inflamatórios, em particular dexametasona; e

o) fármacos anti-eméticos, em particular dexametasona.

Como parte desta especificação de patente, nós incluímos uma série de exemplos e agora remetemos para eles. Estes exemplos demonstram a eficácia aumentada de ET-743 quando utilizada em combinação com outros fármacos e dizem respeito a diferentes combinações utilizando ET-743.

O Exemplo 1 relaciona-se com combinações efectivas de ET-743 e doxorrubicina para inibições de crescimento tumoral contra os sarcomas marinho e humano em ratinhos atímicos.

O Exemplo 2 mostra que a ecteinascidina 743 (ET-

743) e a doxorubicina produzem efeitos citotóxicos sinérgicos em linhas de sarcoma de tecido mole HT-1080 e HS-18.

Estes dois exemplos mostram mais que efeitos aditivos da combinação de ET-743 com antraciclinas (em particular doxorubicina) que é mais efectivo do que qualquer um sozinho contra tumores humanos (nestas experiências específicas sarcoma), cujos efeitos ocorrem independentemente da sequência de administração. Tais resultados revelam uma clara promessa para o tratamento de pacientes.

O Exemplo 3 mostra um efeito citotóxico sinérgico de ET-743 e cisplatina.

O Exemplo 4 providencia uma avaliação da sequenciação de ET-743 em combinações com agentes de quimioterapia contra um painel de linhas de células tumorais humanas, em particular combinações de ET743 com doxorubicina, taxol, SN-38, cisplatina, e gemcitabina.

Estes dois mostram mais que efeitos aditivos da combinação de ET-743 com compostos anti-tumorais de platina, (em particular Cis-platina) com o nucleósido análogo gemcitabina, e com um inibidor de topoisomerase II (SN38, que é o agente activo produzido a partir do pro-fármaco CPT-11, um fármaco do grupo da camptotecina). Novamente estas combinações são mais efectivas do que qualquer um dos fármacos sozinho contra os tumores humanos (nestas expe-

riências específicas contra uma variedade de células tumorais: sarcoma do ovário, cólon, pulmão, mama, osso), cujos efeitos estiveram dependentes da sequência de exposição em alguns casos. Novamente são uma promessa para o tratamento de pacientes.

Interessantemente, a acção sinérgica foi claramente não previsível: o Exemplo 4 indica que na maioria das combinações testadas, não foi observada qualquer sinergia (de facto, em alguns casos foi reportado antagonismo).

O Exemplo 5 relaciona-se com a avaliação de combinações de ET-743 com doxorrubicina ou trimetrexato ou paclitaxel.

Revela mais do que efeitos aditivos da combinação de ET-743 com antraciclinas (em particular doxorrubicina) que é mais efectiva do que qualquer um deles sozinho contra tumores humanos (nestas experiências específicas sarcoma), cujos efeitos ocorrem independente da sequência de administração. Tais resultados mostram uma clara promessa para o tratamento de pacientes.

Os Exemplos 6 a 8 reforçam e complementam os exemplos prévios, e mostram especialmente a sinergia de ET-743 e doxorrubicina e também de ET-743 com cisplatina.

O Exemplo 9 demonstra um tipo diferente de eficácia das combinações desta invenção, em que uma dose elevada

de dexametasona protege contra a hepatotoxicidade de ecteinascidina-743 (ET-743).

Em resumo, esta invenção providencia consequentemente composições para utilização em tratamento, processos para preparar composições e formas de realização relacionadas.

A presente invenção também se estende aos compostos da invenção para utilizar num método de tratamento, e para a utilização dos compostos na preparação de uma composição para tratamento de cancro.

Assim, a presente invenção pode ser utilizada para tratar qualquer mamífero, notavelmente um ser humano, afectado por cancro que compreende administrar ao indivíduo afectado uma quantidade terapêuticamente efectiva de um composto da invenção, ou uma sua composição farmacêutica.

A presente invenção também se relaciona com preparações farmacêuticas incluindo um veículo farmacêuticamente aceitável, que contém como componente activo um composto ou uns compostos da invenção, assim como os processos para a sua preparação.

Exemplos de composições farmacêuticas incluem qualquer sólido (comprimidos, pílulas, cápsulas, grânulos, etc.) ou líquido (soluções, suspensões ou emulsões) com composição adequada ou administração oral, tópica ou

parentérica, e poderão conter o composto puro ou em combinação com qualquer veículo ou outros compostos farmacologicamente activos. Estas composições poderão necessitar ser esterilizadas quando administradas parentericamente.

A administração dos compostos ou composições da presente invenção poderá ser efectuada através de qualquer método adequado, tal como infusão intravenosa, preparação oral, administração intraperitoneal e intravenosa. Nós preferimos que sejam utilizados tempos de infusão até 24 horas, mais preferencialmente 2 - 12 horas, com 2 - 6 horas principalmente preferidas. São especialmente desejáveis os tempos de infusão curtos que permitem que o tratamento seja levado a cabo sem uma permanência durante a noite no hospital. No entanto, a infusão poderá demorar 12 a 24 horas ou mesmo mais tempo se requerido. A infusão poderá ser levada a cabo a intervalos adequados de digamos 2 a 4 semanas. As composições farmacêuticas contendo compostos da invenção poderão ser distribuídos por encapsulação em lipossoma ou nanoesfera, em formulações de libertação controlada ou através de outros meios de distribuição comuns.

A dosagem correcta dos compostos irá variar de acordo com a formulação particular, o modo de aplicação, e o *situs* particular, hospedeiro e tumor a ser tratado. Outros factores tais como idade, peso corporal, sexo, dieta, altura de administração, taxa de excreção, condição do hospedeiro, combinações de fármacos, sensibilidades

reaccionais e gravidade da doença deverão ser tomados em conta. A administração pode ser levada a cabo continuamente ou periodicamente dentro da dose máxima tolerada.

As combinações desta invenção podem ser utilizadas em pacientes refractários. O leitor é remetido para a WO0069441 para informação sobre esquemas de dosagem para a ET-743 e outra informação de utilização na terapia de combinação desta invenção.

EXEMPLOS DA INVENÇÃO

Exemplo 1

Combinações Efectivas de ET-743 e Doxorrubicina para Inibições de Crescimento de Tumor Contra Sarcomas Murino e Humano em Ratinhos Atímicos

Foi confirmada a actividade clínica de ET-743 em pacientes com sarcoma mole e do osso refractários a quimioterapia prévia incluindo Doxorrubicina (Dx) e Isosfamida. Em vista do potencial valor clínico em combinar ET-743 com Dx nós investigamos esta combinação contra o fibrossarcoma murino UV2237, a sua sublinha resistente a mdr UV2237/ADR e o xenoenxerto de rabdomiosarcoma humano TE671. Ambas a ET743 e a Dx sozinhas foram efectivas contra fibrossarcoma UV2237 murino enquanto que cada uma foi inactiva ou marginalmente activa contra ambos UV2237/ADR e TE671. No entanto, a combinação de ET743 w Dx foi efectiva em todos

os 3 modelos. A sinergia foi particularmente marcada no rabdomyosarcoma TE671 humano e pareceu independente da sequência de fármaco ou combinação.

Após tratamentos de i.v. únicos realizados quando o tumor TE671 era aproximadamente de 100 mg de peso tumoral os valores de inibição de (TWI) e Morte de Células de Log 10 (LCK) foram respectivamente de 46 % e 0,132 para ET-743 (0,1 mg/kg) sozinha, 50 % e 0,33 para Dx (10 mg/kg) sozinha, 77 % e 0,924 para ET-743 (0,1 mg/kg) e Dx (10 mg/kg) dadas simultaneamente, 82 % e 1,12 para a combinação de ET-743 (0,1 mg/kg) dada 1 hora antes de Dx (10 mg/kg) e 75 % e 0,85 para a combinação de ET-743 (0,1 mg/kg) dada 1 h após Dx (10 mg/kg).

Estes dados sugerem que a combinação de ET-743 e Dx pode também ser efectiva em tumores que não sejam sensíveis ou marginalmente sensíveis a estes fármacos dados sozinhos, providenciando assim uma forte justificativa para investigações clínicas utilizando esta combinação.

Exemplo 2

A Ecteinascidina 743 (et-743) e a Doxorrubicina Produzem Efeitos Citotóxicos Sinérgicos em Linhas de Sarcoma de Tecido Mole HT- 1080 e HS-18.

Duas linhas celulares de sarcoma, HT 1080, uma linha celular de fibrosarcoma sensível a ET-743 ($IC_{50} = 10$

pm) e HS-18, uma linha celular de liposarcoma, menos sensível a ET-743 ($IC_{50} = 270$ pm) foram avaliadas relativamente à toxicidade para ET-743 em combinação quer com doxorubicina, trimetrexato ou paclitazael. Quando foi utilizada ET-743 em combinação com cada um destes fármacos a uma razão molar constante, e analisado pelo método de Chou e Talalay, foram obtidos efeitos sinérgicos (72 h de incubação) com a combinação ET-743-doxorubicina, mas não com a combinação de ET-743 com trimetrexato ou paclitaxel. Quando as células foram expostas a ET-743 durante 72 h, e quer a doxorubicina, trimetrexato ou taxol durante as últimas 48 h de incubação, foram também obtidos efeitos sinérgicos com a doxorubicina contra ambas as linhas celulares de sarcoma. De interesse, a sequência paclitaxel seguida por ET-743 foi mais efectiva do que a sequência oposta. Estes resultados encorajam os ensaios clínicos de doxorubicina em combinação com ET-743 para tratar pacientes com sarcoma de tecido mole, uma vez que ambos estes fármacos exibiram actividade contra esta doença.

Exemplo 3

Efeito Citotóxicos Sinérgicos de Et-743 e Cisplatina

A Ecteinascidina 743 (ET-743) exibiu actividade anti-tumoral notável em vários sistemas pré-clínicos e actividade clínica promissora. A ET-743 liga-se a N2 de guaninas no sulco menor e afecta a regulação de transcrição (Minuzzo *et al*, PNAS, Vol. 97,6780-84, 2000).

Estudos prévios indicaram que células deficientes de reparação desigual (MMR) são igualmente sensíveis à ET-743 como células proficientes. As células deficientes NER muito sensíveis à cisplatina são 6-8 vezes menos sensíveis à ET-743. Na base dos diferentes mecanismos envolvidos na reparação de ET-743 e cisplatina e devido ao potencial interesse clínico nesta combinação nós realizamos estudos para avaliar os efeitos citotóxicos de ET-743 e cisplatina em várias linhas celulares de tumor humano. Foram utilizadas neste estudo a linha celular de cancro de ovário humano Igrove-1, uma sublinha resistente a ET-743 (IG/PSC/ET), linhas celulares de cancro de cólon humano HCT 116, (MMR deficientes) e HCT11-ch3 (MMR proficientes).

As células foram tratadas durante 1 ou 24 h com diferentes concentrações de ET-743 ou cisDDP, sozinhas ou em combinações, e a cito-toxicidade foi avaliada através da utilização de um ensaio colorimétrico após manchamento com sulforodamina B. Em todas as linhas foi observado um efeito sinérgico com ambas as exposições de 1 h ou de 24 h. Interessantemente em HCT116 resistente a cisDDP a ET -743 foi aparentemente capaz de reverter a sensibilidade mesmo a concentrações de ET-743 que sozinhas foram marginalmente efectivas. Tomados conjuntamente os dados providenciam uma razão para empreender estudos clínicos combinando ET-743 com cisDDP.

Exemplo 4

Combinações de Et743 com Doxorubicina, Taxol, Sn-38, Cisplatina, e Gemcitabina

A ET-743 foi avaliada em combinação com doxorubicina, taxol, SN-38, cisplatina, e gemcitabina contra um painel de linhas celulares de tumor humano. Estes estudos foram designados para determinar o tipo de interação fármaco-fármaco entre ET-743 e agentes de quimioterapia comuns e a influência da sequência de exposição em atividade anti-tumoral. Foram utilizadas múltiplas combinações de ET-743 com agentes citotóxicos comuns com uma concepção de modelo livre (Laska, *et al.* Biometrics 50:834, 1994) para descrever o tipo de interação fármaco-fármaco. Estes estudos sugerem que independentemente da exposição, é mais tipicamente observado um padrão aditivo de interação fármaco-fármaco.

A interação fármaco-fármaco sinérgica foi observada quando a ET-743 foi combinada contra linhas celulares de tumor de pulmão de célula não pequena (pré-exposição a SN-38), osteossarcoma (pré-exposição a ET-743 seguida por cisplatina), mama (pré-exposição a ET-743 seguida por gemcitabina), cólon (pré-exposição a ET-743 seguida por SN-38 e exposição concorrente com SN-38). Foi observado um padrão de interação fármaco-fármaco aditivo/sinérgico (pré-exposição a ET-743 seguida por SN-38 contra NSCL; pré-exposição a SN-38 contra cólon e NSCL; exposição concorrente com cisplatina contra osteossarcoma, e com SN-38

contra linhas de NSCL). Foi notada evidência de antagonismo quando foi utilizado taxol concorrentemente contra duas linhas NSCL, e doxorrubicina contra uma linha celular de rabdomiosarcoma.

Estes estudos sugerem que a ET-743 que está na Fase II dos ensaios clínicos, poderia ser combinada com vários agentes citotóxicos contra uma vasta gama de tipos de tumor.

Material e Métodos

Cultura Celular:

As linhas celulares tumorais de mama humana (MDA-435, MDA-231, T-470), pulmão de célula não pequena (NCI-H522, NCI-H226, NCI-H23), cólon (HCT-116, HT-29, Colo-320), osteossarcoma (HOS, U-2, OS, SaOS-2), rabdomiosarcoma (RH1, RH30, RD) foram cultivadas em RPMI-1640 suplementado com soro de bovino fetal a 10% e L-glutamina 2 mM. Todas as culturas de reserva foram mantidas em balões de 75 cm² a 37 °C em incubadores humidificados com uma atmosfera de 5 % de CO₂ - 95 % de ar.

Análise de IC₅₀:

Um número pré-determinado de células de tumor cultivadas exponencialmente foram inoculadas em placas de cultura de tecido de 96 poços e deixadas estabilizar duran-

te 24 horas. Mais tarde, uma placa de fármaco consistindo em concentrações diluídas em série de ET-743 ou agentes de quimioterapia comuns foi adicionada às células. As células foram incubadas como uma exposição de 24 horas durante três dias seguida pela adição de MTT durante 4 horas. Os cristais resultantes de formazan foram em seguida solubilizados com ácido/ álcool, com absorvância (570 nm-teste /630 nm - referência) determinada utilizando um leitor de microplaca. Os resultados foram expressos como percentagem de células tumorais mortas comparadas com os controlos de meio.

Estudos de Combinação:

Para os estudos de combinação, o esquema de concentração (expressa como uma percentagem do IC₅₀ do agente individual) utilizado para caracterizar o tipo de interação é mostrado adiante:

Concentração de Fármaco (Expressa como uma percentagem do IC ₅₀)	
<u>ET-743</u>	<u>Agentes comuns</u>
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

Análise Estatística de Estudos de Combinação:

As comparações estatísticas são feitas com cada combinação de teste (75:25 -ET-743/agentes comuns) e os pontos finais (100:0 -ET-743 e 0:100 - agentes comuns). Uma observação estatisticamente significativa requer que exista uma diferença entre o valor de absorvância da combinação (ET-743 e agentes comuns) e ambos os valores de pontos finais (ET-743 e comuns agentes sozinhos). Se a maioria dos valores (≥ 3 de 5) estiverem estatisticamente acima ou abaixo da linha então é descrito o antagonismo ou a sinergia, respectivamente. De outro modo o padrão é mais consistente com uma interação aditiva. A interpretação é muito difícil se existir um declive considerável relativamente à linha que liga os pontos finais. Se o declive das curvas de IC_{50} para os agentes individuais for idêntico (improvável) então pode, em certas alturas, determinar-se o tipo de interação.

Sequenciação de Combinação de ET-743 com Agentes de Quimioterapia		
<u>Tipo de Tumor/ Linha Celular</u>	<u>Condições de Exposição /Agentes</u>	<u>Interações Fármaco- Fármaco Observadas</u>
<u>Osteossarcoma</u>		
NOS	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a cisplatina	Sinérgica
	24 horas de cisplatina seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/ cisplatina	Aditiva

(continuação)

<u>Osteossarcoma</u>		
U2-OS	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a cisplatina	Aditiva
	24 horas de cisplatina seguido por 24 horas de exposição a ET- 743	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/cisplatina	Aditiva
Sa06	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a cisplatina	Aditiva
	24 horas de cisplatina seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/cisplatina	Aditiva/Sinérgica
<u>Pulmão Célula Não Pequena</u>		
	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a taxol	Aditivo
NCB-H226	24 horas de taxol seguido por 24 horas de exposição a ET-734	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/taxol	Antagonista
	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN38	Aditiva/Sinérgica
	24 horas de SN-38 seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva/Sinérgica
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/SN-38	Aditiva
NCB-N522	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a taxol	Aditiva
	24 horas de taxol seguido por 24 horas de exposição a ET-734	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/taxol	Antagonista
	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN38	Aditiva/Sinérgica
	24 horas de SN-38 seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva/Sinérgica
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/SN-38	Aditiva

(continuação)

Pulmão Célula Não Pequena		
NCB-N23	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a taxol 24 horas de taxol seguido por 24 horas de exposição a ET-734 24 horas de exposição concorrente a ET-743/taxol 24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN38 24 horas de SN-38 seguido por 24 horas de exposição a ET-743 24 horas de exposição concorrente a ET-743/SN-38	Aditiva/Antagonista Aditiva Antagonista Aditiva Sinérgica Aditiva/Sinérgica
Mama		
MDA-435	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a gemcitabina 24 horas de gemcitabina seguido por 24 horas de exposição a ET-743 24 horas de concorrente ET-473/gemcitabina	Aditiva Aditiva Aditiva
MDA-231	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a gemcitabina	Aditiva
	24 horas de gemcitabina seguido por 24 horas de exposição a ET-743 24 horas de concorrente ET-473/gemcitabina	Aditiva Aditiva
T47-8	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a gemcitabina 24 horas de gemcitabina seguido por 24 horas de exposição a ET-743 24 horas de concorrente ET-473/gemcitabina	Aditiva Aditiva Aditiva
Cólon		
MCT-116	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN-38 24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN-38 24 horas de exposição concorrente a ET-743/SN	Sinérgica Aditiva Aditiva

(continuação)

<u>Mama</u>		
NT-29	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN-38	Aditiva
	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN-38	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/SN	Aditiva
Colo-320	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN-38	Aditiva
	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a SN-38	Aditiva/Sinérgica
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/SN	Sinérgica
<u>abdoroio-sarcoma</u>		
RN1	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a doxorubicina	Aditiva
	24 horas de doxorubicina seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/doxorubicina	Antagonista
RD	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a doxorubicina	Aditiva
	24 horas de doxorubicina seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/doxorubicina	Aditiva/Antagonista
RN30	24 horas de ET-743 seguido por 24 horas de exposição a doxorubicina	Aditiva
	24 horas de doxorubicina seguido por 24 horas de exposição a ET-743	Aditiva
	24 horas de exposição concorrente a ET-743/doxorubicina	Antagonista

Conclusões-Resumo

Estes estudos sugerem que independentemente da sequência de exposição entre ET-743 e agentes de quimio-

terapia comuns, é mais tipicamente observado um padrão aditivo de interacção fármaco-fármaco.

A evidência de sinergia foi observada quando as linhas NC1-H522 e NC1-H23 NSCL foram expostas previamente a SN-38, pré-exposição a ET-743 com cisplatina contra osteossarcoma HOS, linha celular de mama T-470 com gemcitabina, SN-38 contra cólon HCT-116, e exposição concorrente com SN-38 contra linha celular de tumor do cólon Colo-320.

A evidência de antagonismo foi observada quando foi utilizado taxol concorrentemente contra a linha celular NC1-H226 e NC1-H23 NSCL e doxorrubicina contra a linha celular de tumor de rabdomiosarcoma RHI.

Exemplo 5

Interacção Entre Et-743 E Outros Agentes Antineoplásicos

Embora a ET-743 esteja presentemente em ensaios clínicos de cancros humanos, os mecanismos de actividade anti-tumoral de ET-743 não foram completamente elucidados. O objective deste estudo foi avaliar a natureza da interacção entre ET-743 e outros agentes antineoplásicos (doxorrubicina; DXR, trimetrexato; TMTX e Paclitaxel; Taxon) utilizando o método de índice de combinação (CI) de Chou e Talalay. Para entender melhor como é que a ET-743 poderá ser utilizada clinicamente, o presente estudo utilizou ensaios SRB para examinar a toxicidade citológica

resultante da combinação de ET-743 com três outros agentes antineoplásicos nas diferentes programações de administração em duas linhas celulares de sarcoma de tecido mole, HT-1080 e HS-18, *in vitro*. A DXR foi o único agente que resultou em sinergia independente da sequência quando combinada com a ET-743. A exposição concorrente de ET-743 com DXR resultou em interações sinérgicas em ambas as linhas celulares.

As CIs (média) com esta programação foram 0,86, 0,83, 0,84 e 0,85 a 50, 75, 90 e 95 % de morte celular, respectivamente, em células HT-1080 e 0,89, 0,74, 0,64 e 0,60 a 50, 75, 90 e 95 % de morte celular, respectivamente, em células HS-18. A sequenciação com ET-743 durante 24 h antes de DXR foi o regime mais efectivo contra ambas as linhas celulares; resultou em CI consistentemente baixo de até um nível de cerca de 90 % de morte celular para ambas as linhas celulares. A exposição a Taxol antes de ET-743 foi também um regime efectivo. Estes resultados sugerem que a combinação de ET-743 e DXR deverá ser explorada adicionalmente em ensaios clínicos no tratamento de sarcoma de tecido mole.

Materiais E Métodos

Químicos

A ET-743 foi providenciada por Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, Madrid, Espanha), e foi preparada como uma solução de reserva 2 mM em dimetilsulfóxido. O Paclitaxel e

a DXR foram obtidos a partir da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O TMTX foi fornecido por Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich).

Culturas Celulares

As linhas celulares de sarcoma de tecido mole, HT-1080 e HS-18 foram mantidas como culturas de monocamada em RP<I-1640 contendo soro bovino fetal a 10 %.

Ensaio de Toxicidade citológica SRB

A toxicidade citológica a fármacos foi determinada através do ensaio de toxicidade citológica SRB levado a cabo em placas de microtitulação de 96 poços como descrito. As células foram colocadas em poços duplicados (5000 células/poço) e expostas a fármacos a diferentes concentrações. As células foram fixadas com solução TCA a 50 % durante 1 h e foi adicionado SRB a 0,4 % (Sigma) a cada poço. Após uma incubação de 30 min, as placas foram lavadas com ácido acético a 1 % e lidas a 570 nm num contador de microplaca Biowhitaker 2001. Os poços com células não contendo fármacos e com meio mais fármacos mas sem células foram utilizados como controlos positivos e negativos, respectivamente.

Exposição Concorrente a ET-743 e DXR, TMTX ou Paclitaxel

As células foram semeadas em placas de 96 poços, como descrito previamente. As células foram tratadas com

sete concentrações diferentes dos fármacos sozinhos ou em misturas de combinações numa razão molar de 1:100 (ET-743: os outros fármacos). Após 72 h de exposição, a inibição de crescimento foi medida utilizando o ensaio SRB.

Exposição Sequencial a ET-743 e DXR, TMTX ou Paclitaxel

Utilizando as mesmas condições experimentais descritas acima, nós expusemos as células a três concentrações diferentes de fármacos que representam o IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} de ET-743, DXR, TMTX e paclitaxel, respectivamente. Após 24 horas de pré-tratamento com ET743 ou com a combinação de fármaco, os segundos fármacos foram adicionados aos respectivos poços durante 48 h. A inibição de crescimento foi determinada utilizando o ensaio de SRB).

Análise do Ciclo Celular

As células de crescimento exponencial foram tratadas com ou sem fármacos durante várias horas. As células foram em seguida recolhidas e fixadas com metanol a 70 % arrefecido em gelo. O ADN foi manchado com iodeto de propídio como descrito previamente. Em seguida milhares de células manchadas foram analisadas num classificador de células activado com fluorescência Becton Dickinson (FACS).

Determinação de Sinergia e Antagonismo e Construção de Isobogramas

O CI foi calculado pela equação de Chou-Talalay,

que tem em conta ambas a potência (D_m ou IC_{50}) e a forma da curva de efeito da dose (o valor m). A equação geral para o isobolograma clássico ($CI = 1$) é dada por:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

em que $(Dx)_1$ e $(Dx)_2$ nos denominadores são as doses (ou concentrações) para D_1 (ET-743) e D_2 (outro fármaco) sozinho que origina uma inibição de $X\%$, enquanto que $(D)_1$ e $(D)_2$ nos numeradores são doses de ET-743 e outro fármaco em combinação que também inibiram $X\%$ (*i.e.* isoeffectivo). $CI < 1$, $CI = 1$, $CI > 1$ indicaram sinergia, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente.

As $(Dx)_1$ ou $(Dx)_2$ podem ser prontamente calculadas a partir da equação de efeito médio de Chou e Chou *et al*:

$$Dx = Dm [fa / (1 - fa)]^{1/m} \quad (B)$$

em que D_m é a dose de efeito médio que é obtida a partir do anti-log da intercessão X do gráfico de efeito médio, $X - \log(D)$ versus $Y - \log[fa / (1 - fa)]$ ou $D_m = 10^{-(Y - \text{intercessão})/m}$, e m é o declive do gráfico de efeito médio. O suporte lógico computacional de Chou e Chou permite o cálculo automático dos valores de m , D_m , Dx , e CI . A partir de $(D_m)_1$, $(Dx)_2$, e $D_1 + D_2$, torna-se fácil construir isobologramas automaticamente com base na Eq. A.

Para os isobogramas não exclusivos mutuamente conservadores de dois agentes, é adicionado um terceiro termo,

$$(D1) (D2) / (DX)_1 (DX)_2 \quad (C)$$

à Eq. A.

Para simplicidade, o terceiro termo é usualmente omitido, e conseqüentemente é indicada a suposição mutuamente exclusiva ou isobograma clássico. Nos Resultados 2 e 3, são apresentados os valores de CI obtidos a partir do cálculo clássico (mutuamente exclusivo).

Resultado 1

Toxicidade citológica de quatro fármacos em HT-1080 e S18			
		IC ₅₀ para células de sarcoma de tecido mole humano	
		HT-1080	HS-18
ET-743.	(nM)	0,01	0,27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70000
Paclitaxel	(nM)	1:3	10

Esta tabela mostrou que ambas as linhas celulares HT-1080 e S18 foram mais sensíveis a ET-743 que a outros agentes anti-neoplásicos.

Efeito de cada agente na distribuição do ciclo celular contra células HS-18					
24 h e 72 h pós o tratamento com dose aproximada de IC ₅₀					
Fármacos	Dose	HR	% G1	% S Fase	% G2-M
Controlo			76,3	11,2	12,5
ET-743	270 pM	24	32,4	47,6	20,0
		72	86,7	8,4	4,9
DXR	225 nM	24	10,1	64,9	25,0
		72	1,3	63,8	34,9
TMTX	70 uM	24	44,2	53,8	1,9
		72	35,5	57,6	7,0
Paclitaxel	10 nM	24	32,8	52,5	15,5
		72	23,5	58,7	26,2

Efeito de cada agente na distribuição do ciclo celular contra células HT-1080					
24 h e 72 h após tratamento com dose aproximada de IC ₅₀					
Fármacos	Dose	HR	% G1	% S Fase	% G2-M
Controlo			47,5	35,8	16,7
ET-743	10 pM	24	42,6	36,1	21,3
		72	83,1	10,2	6,7
DXR	25 nM	24	36,1	17,5	46,4
		72	46,2	5,3	48,5
TMTX	6 nM	24	31,9	56,8	11,3
		72	32,0	53,7	14,4
Paclitaxel	1,3 nM	24	45,4	37,3	17,3
		72	86,0	9,0	5,0

O resultado 2 mostra o CI para células HT-1080 e HS-18, respectivamente, que foram simultaneamente expostas a ET-743 e a um dos fármacos anti-neoplásicos, tais como DXR, TMTX ou paclitaxel, em mistura de combinação com uma razão molar de 1 até 100. Quando as células foram tratadas com ET-743 e DXR, os valores de CI foram todos inferiores a 1, indicando um efeito de sinergia em ambas as linhas celulares. Os CIs (média) com esta programação foram 0,86, 0,83, 0,84 e 0,85 a 50, 75, 90 e 95 % de morte celular, respectivamente, em células HT-1080 e 0,89, 0,74, 0,64 e 0,60 a 50, 75, 90 e 95 % de morte celular, respectivamente, em células HS-18. Este resultado mostrou que o tratamento concorrente de ET-743 e DXR produziu um efeito citotóxico sinérgico. Em contraste, quando as células foram tratadas com ET-0743 e TMTX ou paclitaxel, foi observado um efeito citotóxico de antagonismo.

O gráfico de CI foi obtido a partir de ambas as linhas celulares que foram inicialmente expostas a ET-743 durante 24 h, seguido por DXR durante 48 h. Em ambas as linhas celulares, o tratamento com ET-743 seguido por DXR exibiu efeito citotóxico sinérgico, o valor de CI de HT-1080 a um nível de morte celular de 80 % foi de $0,64 \pm 0,12$ e o de HS-18 a um nível de morte celular de 88 % foi de $0,24 \pm 0,06$. Em contraste, o tratamento com DXR seguido por ET-743 (Resultado 3a, figura inferior) demonstrou o bom valor de CI à primeira vista, no entanto, o valor de CI de HT-1080 a um nível de morte celular de 80 % foi de $1,00 \pm$

0,03, indicando que o efeito dos dois agentes foi aditivo, em adição, o CI à fracção mais elevada de morte foi pior que aquele à fracção média de morte em ambas as células.

Quando as células foram expostas a ET-743 seguido por TMTX, os valores de CI de HT-1080 apresentaram-se próximos de um ou superiores a um, indicando que o efeito dos dois agentes são antagonismo ou aditivo. Em contraste, aqueles de HS-18 foram todos inferiores a 0,6, demonstrando que estes dois fármacos têm efeito de sinergia. Quando as células foram tratadas com TMTX seguido por ET-743, foi observado efeito aditivo em ambas as linhas celulares HT-1080 e HS-18.

O tratamento com paclitaxel seguido por ET-743 produziu efeito citotóxico sinérgico. Quando as células foram expostas a paclitaxel seguido por ET-743, o valor de CI de HT-1080 a um nível de morte celular de 89 % foi de $0,92 \pm 0,06$ e o de HS-18 a um nível de morte celular de 78 % foi de $0,38 \pm 0,13$.

Resumo

A ET-743 foi altamente activa contra células de sarcoma de tecido mole humano, especialmente contra a linha celular de fibrosarcoma maligno HT-1080.

A DXR resultou em sinergia independente da sequência quando combinada com ET-743, no entanto, a

sequenciação com ET-743 seguida por DXR foi mais efectiva contra ambas as linhas celulares.

A exposição a paclitaxel seguida por ET-743 foi também um regime efectivo contra células de sarcoma de tecido mole humano, enquanto que a exposição concomitante foi antagonista.

Exemplo 6

Combinações *in vivo* de agentes quimioterapêuticos com Ecteinascidina 743 (Et743) contra tumores sólidos.

Foram descritos vários mecanismos únicos de acção para Et743 incluindo ligação ao sulco menor de ADN, alquilação de N2 da guanina, inibição transcricional do gene MDR1 (Jin *et al.*, PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo *et al.*, PNAS 97, 6780, 2000) e actua contrariamente à activação do receptor nuclear SXR (Synold *et al.*, Nature Med 7, 584, 2001). Como um agente único, a Et743 inibe o crescimento do tumor *in vivo* conseguindo remissões completas (CR) contra várias estirpes de tumor humano (Hendriks *et al.*, Ann Oncol 10,1233, 1999) incluindo melanoma (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), ovário (HOC 22) e carcinoma da mama (mix-1). A eficácia de Et743 em combinação com fármacos que actuam por mecanismos alternados poderá providenciar oportunidades para reduzir as toxicidades de quer fármaco ou para

potenciar a efectividade de um fármaco em cancros resistentes ou recorrentes.

Para esta avaliação foram administrados vários agentes incluindo doxorubicina (DOX, 8 mg/Kg), cisplatina (DDP; 12 mg/Kg) e vinblastina (VINB; 6 mg/Kg) antes/depois de Et743 (0,2 mg/Kg) com 1 hora de pré-tratamento, qdx5, em um ou mais dos seguintes tumores: condrosarcoma (CSHA), osteossarcoma (OSA-FH), fibrosarcoma (SW684), ovário (MRI-H-1834), NSCL (LX-1) e renal (MRI-H-121) com actividade definida como < 50 % T/C. No modelo de fibra oca (HF), a sequência de DOX, 1 h pré-Et743 foi consistentemente mais efectivo que a Et743 sozinha em condrosarcoma (6 % vs. 10 %), fibrosarcoma (33 % vs. 48 %) e osteossarcoma (20 % vs. 34 %). Os xenoinxertos de osteossarcoma produziram resultados semelhantes de 17 % vs. 43%. Os estudos de HF com DPP revelaram que Et743 pré-DDP foi mais efectivo que a Et743 sozinha em ovário (28 % vs. 100 %) e condrosarcoma (15 % vs. 19 %) e actividades equivalentes em osteossarcoma (36 % T/C). Os dados de xenoinxerto confirmam a sequência de Et743 pré-DDP como mais efectivo que a Et743 sozinha (35 % vs. 66 %). A única excepção foi em NSCL onde a Et743 sozinha não foi activa (62 % T/C) mas DPP seguido por Et743 produziu CR (<1 % T/C). Em xenoinxertos renais a Et743 sozinha foi muito activa (22 % T/C) mas a Et743 seguida por VINB também produziu CR (<1 % T/C). Estão em curso estudos separados com outros agentes comuns em xenoinxertos de tumor da mama, renal, melanoma e gástrico.

Exemplo 7

Actividade pré-clínica e distribuição biológica de combinações de Ecteinascidina 743 (ET-743) e Doxorrubicina (DOX) em rabdomiosarcoma humano.

A ET-743 é o primeiro de uma nova classe de agentes anti-tumorais que exhibe actividade anti-tumoral. A ET-743 mostrou actividade em pacientes com sarcoma refractário a DOX e ifosfamida. Em vista do seu potencial como um fármaco efectivo, nós investigamos (1) a actividade anti-tumoral pré-clínica da combinação de ET-743/DOX contra o rabdomiosarcoma humano TE 671 e (2) interacções possíveis entre os fármacos e sua distribuição biológica em ratinhos nus e xenoenxertos de tumor.

In vitro: O efeito de cada fármaco ou combinação após 1 h de exposições foi avaliado através de ensaio clonogénico. A ET-743 ou a DOX sozinha revelaram actividade anti-tumoral contra as células TE 671. A combinação de acordo com a análise de isoblograma e de Índice de Combinação, foi pelo menos aditivo em várias linhas de células de tumor incluindo TE 671.

In vivo: foram administrados tratamentos simples iv (ET-743, 0,1 mg/Kg; DOX, 10mg/Kg) em ratinhos nus quando os tumores xenoenxertados pesavam aproximadamente 100 mg. Os valores de inibição de peso de tumor/Log10 de Morte Celular foram 46 %/0,132 para ET sozinha, 50 %/0,33 para

DOX sozinha, 77 %/0,924 para ET-743 e DOX administradas simultaneamente, 82 %/1,12 para a combinação de ET-743 administrada 1 h antes de DOX, e 75 %/0,85 quando a ET-743 foi administrada 1 h após a DOX. Foi também observado um efeito sinérgico contra o fibrosarcoma murino UV2237 e contra sua sublinha resistente a fármacos múltiplos UV2237/ADR.

Estes dados mostram um efeito sinérgico de ET-743/DOX e parece ser independente da sequência de fármaco ou combinação nos cenários estudados até agora. Nem o plasma nem as concentrações tumorais de DOX são significativamente diferentes quando DOX foi administrada sozinha ou em combinação com ET-743. A avaliação farmacocinética (PK) de ET-743 administrada sozinha ou em combinação com DOX está em curso. A combinação de ET-743 e DOX parece aditiva *in vitro* mas sinérgica *in vivo* em rhabdomiosarcoma TE 671. O perfil de PK de DOX não é influenciado por tratamento concomitante com ET-743. Estes dados providenciam uma razão para se utilizar esta combinação em ensaios clínicos dentro em breve.

Exemplo 8

ET-743 e cisplatina (DDP) revelam sinergia *in vitro* e *in vivo* contra linhas celulares de sarcoma e carcinoma do ovário humanas.

Nós mostramos aqui que a ET-743 intensifica a actividade de DDP tanto *in vitro* como *in vivo*. Em várias

linhas celulares de cancro incluindo carcinoma intestinal (HCT116), carcinoma do ovário (Igrov-1, A2780) humanas, suas sublinhas resistentes (Igrov1/PSC-ET e 1A9, respectivamente), e rabdomiosarcoma (TE671), concentrações inferiores de ET-743 utilizada como um agente único poderiam potenciar a actividade de DDP em pelo menos 2 vezes. As concentrações correspondendo a IC_{30}/IC_{50} de ET-743 resultaram em efeitos tanto aditivos como sinérgicos. Estes resultados conduziram a estudos *in vivo* utilizando modelos de xenoenxerto para estudar combinações de fármaco efectivas com ET-743.

Em TE671 transplantado sc, parcialmente sensível quer a ET-743 e DDP, a combinação dos dois fármacos produziu um efeito anti-tumoral muito maior que aquele conseguido com qualquer um dos fármacos utilizado em seus níveis de MTD respectivos. O tumor do ovário 1 A 9 que é normalmente resistente a ambas ET-743 e DDP as agentes únicos, em combinação produziu uma inibição de crescimento tumoral superior a 50 %. O carcinoma HOC8 de ovário humano transplantado ortotopicamente, produzindo nódulos tumorais na cavidade peritoneal com ascite, que é resistente a ET-743 e parcialmente sensível a DDP, em combinação resultou num aumento dramático da sobrevivência mesmo a uma dose de ET-743 de 0,05 mg/Kg (1/4 MTD) e não provocou qualquer toxicidade significativa. Uma dose de ET-743 de 0,15 mg/Kg aumentou marcadamente a sobrevivência, mas existiu também um aumento na toxicidade como indicado por uma perda de peso, que foi significativamente superior àquela que foi observada após tratamento com cada fármaco.

Estas descobertas oferecem uma razão forte para conceber ensaios clínicos utilizando a combinação de ET-743 e DDP em sarcomas e cancros do ovário. Estão em progresso estudos *in vitro* e *in vivo* are para elucidar os mecanismos subjacentes à sinergia entre ET-743 e DDP nestes tipos de cancro.

Exemplo 9

A Dexametasona (dex) em Dose Elevada Protege Contra a Hepatotxicidade de Ecteinascidina-743 (ET-743) no Rato

A ET-743, um agente derivado a partir de um tunicado marinho, está actualmente em ensaio clínico de fase II. Exibiu actividade clínica contra sarcomas, e os dados preliminares sugerem actividade contra carcinoma da mama e do ovário. No entanto, ocorre hepatotoxicidade caracterizada por transaminite reversível na maioria dos pacientes tratados e colestase numa minoria. Na espécie animal mais sensível, o rato, a toxicidade de ET-743 é caracterizada por necrose hepática e inflamação do ducto biliar. À luz da actividade anti-inflamatória de dex, nós investigamos o seu efeito na lesão no fígado induzida por ET-743 no rato. Os ratos fêmea Wistar receberam uma dose iv única de ET-743 (40 µg/kg). Alguns ratos foram pré-tratados com uma dose oral única de dex quer a 1, 5, 10 ou 20 mg/kg 24 h antes do tratamento com ET-743. Foram avaliadas a patologia no fígado e as concentrações no plasma de fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (GOT)

e bilirrubina total (TB) até 3 dias após a administração de ET-743. As secções histológicas convencionais dos fígados foram examinadas por microscopia com luz.

Aos 2 dias após o tratamento com ET-743, os fígados dos ratos que receberam a ET-743 sozinha exibiram inflamação do ducto biliar, variações degenerativas surpreendentes nas células epiteliais biliares e zonas de necrose hepática. Os níveis de plasma de ALP e GOT estavam significativamente elevados após 2 dias. A colestase foi reflectida por um aumento dramático nas concentrações TB de no plasma, que começou no dia 2 após a ET-743. As variações histopatológicas induzidas pela ET-743 e elevação de ALP, GOT e TB no plasma foram totalmente anuladas em ratos pré-tratados com 10 ou 20 mg/kg de dex.

Enquanto que dex a 1 mg/kg revelou pouca protecção, a 5 mg/kg foi moderadamente protectora. Os níveis no plasma de ET-743 em ratos que receberam dex (50 mg/kg) diariamente durante 3 dias antes de ET-743 não decresceram comparados com aqueles em ratos com a ET-743 sozinha. Além disso, a actividade de ET-743 contra melanoma B16 implantado em ratinhos não foi impedido por dexametasona. Estas descobertas sugerem que a adição de dose elevada de dexametasona ao regime de ET-743 poderá melhorar a sua hepatotoxicidade em pacientes com cancro.

REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de uma combinação sinérgica de ET-743 e outro fármaco seleccionado a partir do fármaco antraciclina, um fármaco de platina, um fármaco que possui como alvo a topoisomerase, a fármaco taxano, um fármaco anti-metabolito, ou um fármaco anti-mitótico no fabrico de um medicamento para tratamento de um tumor.

2. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e doxorubicina.

3. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e cisplatina.

4. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e paclitaxel.

5. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e gemcitabina.

6. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e SN-38.

7. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e trimetrexato.

8. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a terapia de combinação emprega ET-743 e vinblastina.

9. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 3, 4 ou 7 para tratamento de sarcoma.

10. A utilização de acordo com a reivindicação 3 ou 6 para tratamento de cancro do cólon.

11. A utilização de acordo com a reivindicação 3 para tratamento de carcinoma intestinal.

12. A utilização de acordo com a reivindicação 3 ou 6 para tratamento de cancro do pulmão.

13. A utilização de acordo com a reivindicação 5 para tratamento de cancro da mama.

14. A utilização de acordo com a reivindicação 8 para tratamento de cancro renal.

15. A utilização de acordo com qualquer reivin-

dicação precedente, em que ET-743 e o outro fármaco são providenciados como um medicamento único.

16. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que ET-743 e o outro fármaco são providenciados como medicamentos separados.

17. A utilização de acordo com a reivindicação 16, em que o medicamento separado contendo ET-743 é para administrar ao mesmo tempo que o medicamento contendo o outro fármaco.

18. A utilização de acordo com a reivindicação 16, em que o medicamento separado contendo ET-743 é para administrar numa altura diferente que o medicamento contendo o outro fármaco.

19. A utilização de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que o outro fármaco ou a combinação é administrada por encapsulação de lipossoma ou de nanoesfera.

20. A utilização de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que a terapia de combinação emprega adicionalmente dexametasona.

21. Uma combinação sinérgica de ET-743 e outro fármaco seleccionado a partir de um fármaco antraciclina,

um fármaco de platina, um fármaco que possui como alvo a topoisomerase, um fármaco taxano, um fármaco anti-metabolito, ou um fármaco anti-mitótico para utilização no tratamento de um tumor como descrito em qualquer reivindicação precedente.

Lisboa, 1 de Abril de 2011

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 0055441 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Minuzzo et al. *PNAS*, 2000, vol. 97, 6780-84
- Laska et al. *Biometrics*, 1994, vol. 50, 834
- Jin et al. *PNAS*, 2000, vol. 97, 6775
- Minuzzo et al. *PNAS*, 2000, vol. 97, 6780
- Symold et al. *Nature Med*, 2001, vol. 7, 554
- Handriks et al. *Ann Oncol*, 1999, vol. 10, 1233