

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO SOBRE A SEGURANÇA E A VIABILIDADE
DO USO CLÍNICO DO NOVO ANTAGONISTA DA
BOMBESINA, RC-3095, EM PACIENTES PORTADORES
DE NEOPLASIAS SÓLIDAS AVANÇADAS:**

Análise toxicológica confirmatória em roedores e resultados preliminares
do primeiro estudo de Fase I em seres humanos

MAURO HOROWITZ

Orientador:

PROF. DR. GILBERTO SCHWARTSMANN

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE, OUTUBRO DE 2000

Catálogo na Publicação

H816e Horowitz, Mauro

Estudo sobre a segurança e a viabilidade do uso clínico do novo antagonista da bombesina, RC-3095, em pacientes portadores de neoplasias sólidas avançadas : análise toxicológica confirmatória em roedores e resultados preliminares do primeiro estudo de Fase I em seres humanos / Mauro Horowitz ; Orient. Gilberto Schwartzmann. -- 2000.
91 f. : il.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Clínica Médica e Ciências Médicas, Porto Alegre, 2000.

1. Neoplasias : Tratamento : RC-3095 : Bombesina. I. Schwartzmann, Gilberto. II. Título.

Para Dado, Marcinha e Zaida

AGRADECIMENTOS

Essa tese é o resultado de um árduo trabalho, que seria impossível sem a participação de diversas pessoas. Desejo, portanto, registrar o meu sincero agradecimento aqueles que ajudaram a tornar realidade a concretização desse sonho.

Ao Prof. Gilberto Schwartzmann, orientador dedicado, colega e, sobretudo, amigo. Com a sua inteligência, sensibilidade e inesgotável capacidade de trabalho, é a certeza de maior qualidade, dinamismo e humanismo no nosso meio acadêmico.

À SOAD, através de toda a sua equipe. Inexperiente na área de pesquisa clínica e experimental em Oncologia, tive uma acolhida generosa e procurei me espelhar nesses excelentes profissionais para aprender não apenas Ciência, mas sobretudo a arte de conviver com pacientes em situação tão delicada.

À enfermeira Luciane Di Leoni, pelos inestimáveis apoio e incentivo.

Aos biólogos Anna Isabel Cancela, Ana Paula Caldas e Dennis Mans, pelo auxílio constante.

Ao acadêmico de Medicina Valentino Magno, pela incansável colaboração.

À secretária da SOAD, Rosana Rodrigues, sempre disposta e prestativa.

Ao Prof. Schally (Universidade de Tulane, EUA) e ao Dr. Reissmann (Asta Laboratories, Alemanha) que, mesmo de outros países, mostraram-se sempre acessíveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica e Ciências Médicas, seus professores e funcionários, especialmente às secretárias Helena Costa e Débora Campos Velho.

À gloriosa Brigada Militar, exemplo de tradição e entusiasmo.

À minha esposa e aos meus filhos.

SUMÁRIO

Introdução	5
1 Aspectos gerais	5
2 Revisão da literatura	7
3 Objetivos	23
4 Referências bibliográficas	24
Confirmatory animal toxicological study and the first Phase I trial of the bombesin-like antagonist RC-3095 in patients with advanced solid tumors: study discontinuation due to the occurrence of formulation problems	31
Abstract	32
Introduction	33
Material and methods	35
Results	40
Discussion	45
References	49
Estudo toxicológico confirmatório com o antagonista de receptores do tipo bombesina, RC-3095, em roedores e o primeiro estudo de Fase I em pacientes com tumores sólidos avançados: interrupção temporária do estudo devido a problemas de formulação	54
Resumo	55
Introdução	56
Material e métodos	58
Resultados	64
Discussão	69
Referências bibliográficas	73
Conclusão	78
1 Conclusão geral	78
2 Conclusões específicas	78
Comentários finais	80
Anexos	82
Anexos I	83
Anexos II	86
Anexos III	87
Anexos IV	91

INTRODUÇÃO

1 ASPECTOS GERAIS

A despeito dos importantes avanços ocorridos na curabilidade de vários tipos de neoplasias malignas avançadas, como as leucemias da infância, os linfomas e os tumores de células germinativas, resultados semelhantes não têm sido observados na grande maioria dos tumores sólidos comuns do adulto (1). Para estes, as modalidades de tratamento disponíveis produzem um impacto ainda muito limitado nas curvas de sobrevivência (2).

Além disso, os tratamentos sistêmicos disponíveis que utilizam drogas citotóxicas clássicas – os quimioterápicos – apresentam baixo índice terapêutico, possuem um risco de importante toxicidade nas doses utilizadas na rotina e estão, via de regra, associados a efeitos adversos significativos. Isto decorre, sobretudo, devido à sua baixa especificidade pelo tecido tumoral em relação aos tecidos saudáveis. Da mesma forma, atuando em tecidos com atividade proliferativa, esses agentes produzem toxicidade em tecidos normais que apresentam altas taxas de renovação, como o trato gastrointestinal, a medula óssea e os folículos pilosos. Soma-se a isso a ocorrência de novas mutações induzidas pelos efeitos tóxicos das drogas no DNA, o que acaba por conferir um risco adicional de resistência aos agentes quimioterápicos clássicos (3).

Portanto, é de fundamental importância que novos agentes e/ou estratégias de tratamento, agindo por intermédio de novos mecanismos de ação, sejam incorporados à prática clínica de pacientes com neoplasias malignas. O principal mecanismo responsável pelo crescimento tumoral centra-se na ativação anormal de genes, cujos produtos sinalizam no sentido da proliferação tumoral. Normalmente, esses produtos ou fatores

de crescimento tumoral estabelecem alças de auto-estimulação tumoral (autócrina) ou alças de estimulação a células tumorais vizinhas (parácrina). A identificação das mesmas constitui-se em uma oportunidade para que sejam desenvolvidos tratamentos com maior seletividade contra o tumor através de substâncias que possam bloquear essa via de estimulação especificamente sobre as células tumorais (4).

A bombesina é um peptídeo que foi primeiramente isolado por Anastasi e colaboradores a partir da pele do sapo *Bombina bombina* em 1971 (5). Possui atividade biológica especialmente no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central. Um análogo mamífero da bombesina, com potente atividade liberadora de gastrina, o peptídeo liberador de gastrina (GRP), foi caracterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos por McDonald e colaboradores (6). O GRP e a bombesina têm em comum nove de dez aminoácidos C-terminais.

Com base na observação de que fatores de crescimento semelhantes à bombesina podem ser importantes na estimulação da proliferação em vários modelos tumorais de ratos e humanos, em especial no câncer de pulmão de pequenas células, Schally e seu grupo sintetizaram uma série de antagonistas da bombesina com finalidade terapêutica contra o câncer. Os antagonistas da bombesina constituem uma nova abordagem experimental no tratamento do câncer cujo objetivo é a interferência em mecanismos de estimulação autócrina e/ou parácrina críticos para a manutenção da atividade proliferativa de vários tumores humanos (7). O RC-3095 é um desses agentes, tendo sido selecionado para estudos clínicos iniciais em pacientes portadores de neoplasias avançadas devido ao seu perfil de atividade antitumoral e toxicidade favoráveis em modelos animais (8).

Nesta tese, o autor descreve inicialmente os resultados de uma avaliação confirmatória da segurança toxicológica do RC-3095 para estudos em seres humanos, utilizando camundongos Balb-C e, posteriormente, ratos Wistar. O RC-3095 foi administrado por via subcutânea, diariamente, por 21 dias nas doses de 8, 16 e 32 µg/Kg, respectivamente, e não produziu letalidade nem efeitos adversos locais ou sistêmicos detectáveis nesses animais. Os animais dos braços experimentais foram comparados com animais que

receberam os mesmos esquemas de administração e volumes de solução de NaCl a 0,9%.

Uma vez confirmados os resultados quanto à segurança do RC-3095, procedeu-se à realização de um estudo de Fase I em pacientes com tumores sólidos avançados. Para tal, o RC-3095 foi administrado por via subcutânea em diferentes níveis de dose em grupos consecutivos de pacientes, visando a avaliar sua segurança para uso em seres humanos e identificar uma dose recomendável para estudos clínicos de Fase II. Foram estudados cinco níveis de dose, nos quais não foram observados efeitos tóxicos significativos devido à administração do RC-3095.

É interessante observar que houve regressão tumoral objetiva em uma paciente portadora de carcinoma medular de tireóide refratário a vários tipos de tratamento, considerando-se, sobretudo, que as doses estudadas são totalmente livres de toxicidade clínica limitante. Infelizmente, o estudo teve de ser interrompido temporariamente devido a problemas de formulação do agente RC-3095 no quinto nível de dose estudado. Isto nos levou novamente a estudos de laboratório, com vistas a obter uma nova formulação do RC-3095 para que pudéssemos dar continuidade a este estudo.

Este é o primeiro estudo clínico com o agente RC-3095 a ser publicado na literatura e foi realizado em colaboração com o laboratório do Dr. Andrew Schally, prêmio Nobel de Medicina, da Universidade de Tulane, EUA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bombesina e peptídeos liberadores de gastrina

A bombesina é um peptídeo 14-aminoácido que foi primeiramente isolado por Anastasi e colaboradores (5) a partir da pele do sapo *Bombina bombina* em 1971. A bombesina tem muitas atividades biológicas, especialmente no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central. Um análogo mamífero da bombesina, com uma potente atividade liberadora de gastrina (peptídeo liberador de gastrina, GRP em inglês) foi ca-

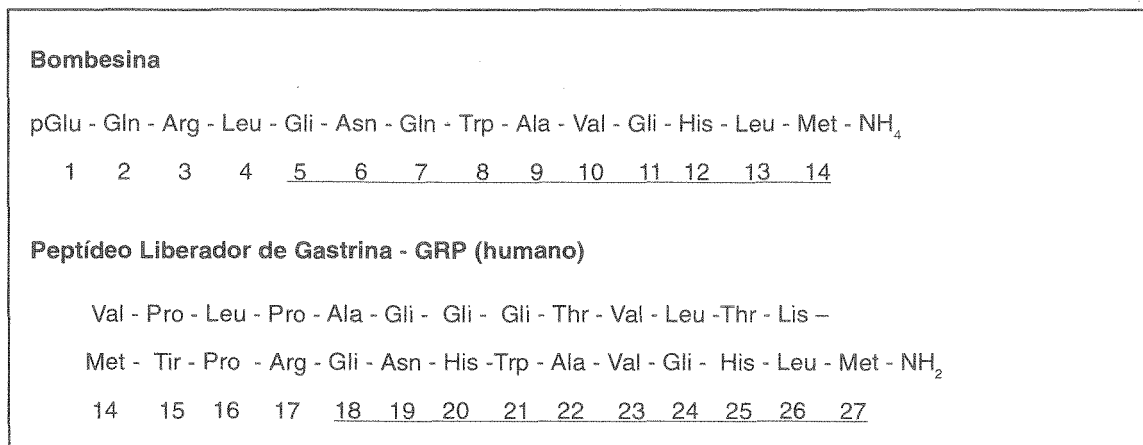


Figura 1 Estrutura da bombesina e do GRP.

racterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos por McDonald e colaboradores. O GRP e a bombesina têm em comum nove de dez aminoácidos C-terminais (6).

A estrutura da bombesina e do GRP é mostrada na Figura 1. É digno de nota que existe uma região α -aminada C-terminal idêntica na bombesina, peptídeos relacionados à bombesina de outros anfíbios e aves, bem como o GRP de mamíferos (9). Broccardo e colaboradores (10) demonstraram que o nonapeptídeo C-terminal da bombesina é tão potente quanto o peptídeo natural. Outros estudos demonstraram que a estrutura mínima associada à atividade biológica é o haptapeptídeo C-terminal da bombesina.

Alguns trabalhos posteriores demonstraram que o efeito central dos peptídeos bombesina-similares sobre a liberação pituitária do hormônio de crescimento e do hormônio luteinizante é provavelmente mediado por receptores específicos da bombesina no sistema nervoso central (8,11). Em 1985, verificou-se que os peptídeos bombesina-similares podem funcionar como fatores de crescimento autócrinos no câncer pulmonar de pequenas células (CPPC) humano, ou seja, que as células do CPPC produzem e secretam peptídeos bombesina-similares que interagem com receptores específicos de membrana na sua própria superfície celular, induzindo, assim, à proliferação celular (12).

Siegfried e colaboradores sugeriram o papel da bombesina/GRP como fator de crescimento autócrino também em câncer pulmonar de não pequenas células (CPNPC) (13). Estudos recentes, como o de Yoshida e colaboradores, confirmaram tais achados em células de câncer de pulmão (14). Gokhale e colaboradores, estudando linhagens de câncer gástrico humano, encontraram evidências de participação da bombesina na proliferação dessas células através da estimulação autócrina (15).

Gugger e colaboradores, ao realizarem um estudo para analisar o papel da bombesina/GRP no câncer de mama humano, detectaram um alto percentual de receptores de bombesina/GRP em tecido mamário neoplásico (16). Bold e colaboradores, estudando linhagens de células de câncer de mama humano estrógeno-dependentes, concluíram que a bombesina tem efeito trófico sobre essas células (17).

Esse mecanismo também foi demonstrado em linhagens de células tumorais pancreáticas por Wang e colaboradores (18) e prostáticas por Han e colaboradores (19). Em estudos recentemente publicados, Markwalder e colaboradores (20) e Sun e colaboradores (21) identificaram uma expressiva presença de receptores de bombesina/GRP em células tumorais prostáticas, o que sugere a participação destes na modulação da progressão tumoral.

O mesmo foi verificado no câncer colorretal humano por Saurin e colaboradores (22), bem como por Chave e colaboradores (23). Uma vez que vários antagonistas da bombesina inibem o crescimento de inúmeros tumores em modelos de tumores experimentais, alguns apresentam a possibilidade de ter aplicações clínicas (24).

2.2 O antagonista da bombesina RC-3095

Existe um interesse crescente no desenvolvimento de novas estratégias experimentais visando à obtenção de maior seletividade para tecidos tumorais. A modulação das atividades dos fatores tumorais autócrinos e parácrinos constitui-se em uma dessas abordagens. Os peptídeos bombesina-similares e GRP-similares podem agir como fato-

res de crescimento autócrino na proliferação de células tumorais, como as do tubo digestivo, do pâncreas, da próstata, da mama e do câncer pulmonar de pequenas células.

O RC-3095 – um antagonista pseudo-nonapeptídeo da bombesina, [D-Tpi⁶, Leu¹³Y (CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesina e análogos sintetizados em laboratório – inibe significativamente o crescimento tumoral em vários tipos de câncer. Além disso, sua atividade antitumoral *in vitro*, bem como em experimentação animal, suas características farmacológicas e seu padrão toxicológico aumentam o interesse para novos estudos. Foi sintetizado por meio de uma técnica de fase sólida da resina benzidrilamina no laboratório de Schally, na Universidade de Tulane, em New Orleans (7).

A estrutura desse pseudo-nonapeptídeo antagonista da bombesina é mostrada na Figura 2. Na posição 6, a forma D do análogo Trp 2,3,4,9 tetraidro-1H-pirido (3, 4-b) ácido indol-3-carboxílico (Tpi) foi introduzido no nonapeptídeo Leu 13 ψ (CH₂-NH) Leu 14- bombesina. A redução da ligação peptídica entre a posição 13 e 14 foi introduzida utilizando-se uma reação de alquilação redutiva (25). O antagonista da bombesina foi sintetizado como dois diferentes sais: o D-21663 é um sal trifluór-acetato e o D-22213 é um sal acetato. O primeiro mostrou-se mais adequado e passou, então, a ser testado.

O RC-3095 (D-21663) foi testado para sua capacidade de inibir a ligação de Tir⁴-bombesina em células 3T3 e H-345 em comparação com a Tir⁴-bombesina, GRP e outros antagonistas bombesina/GRP. A dissociação constante do RC-3095 para células 3T3 foi 13 vezes maior comparativamente à Tir⁴- bombesina e 6 vezes maior comparati-

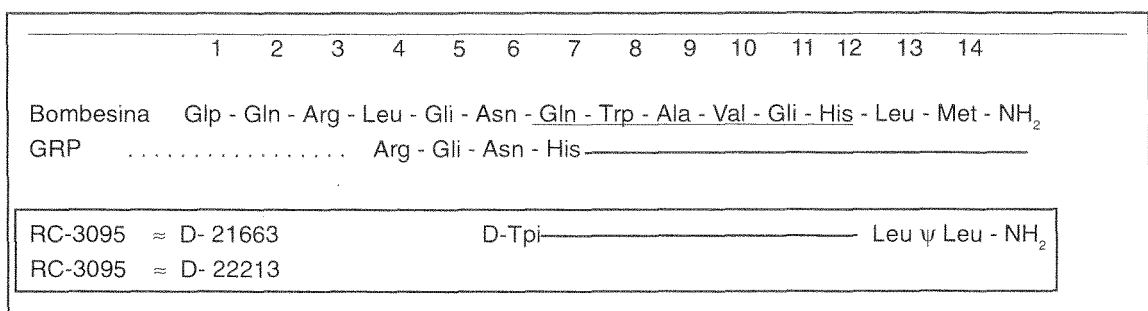


Figura 2 Estrutura do RC-3095.

vamente ao GRP, respectivamente, o que significa que a afinidade de ligação do RC-3095 foi 13 vezes e 6 vezes menor em comparação à Tir⁴-bombesina e ao GRP, respectivamente. No experimento da ligação com o receptor na linha celular H-345 do câncer pulmão de pequenas células, o antagonista RC-3095 da bombesina evidenciou um grau de dissociação constante que foi 20 vezes maior comparativamente à Tir⁴-bombesina e novamente 6 vezes maior comparativamente ao GRP, respectivamente. O RC-3095 inibiu o aumento induzido por GRP da incorporação da (³H) timidine no DNA de células 3T3 com um valor da CI 50 de 10 (Tabela 1).

O RC-3095 possivelmente inibe o crescimento em alguns tipos de tumores por meio da diminuição da regulação dos receptores dos fatores de crescimento epidérmico, uma vez que a bombesina e o GRP agem como mitógenos autócrinos, estimulando o crescimento de tecidos e tumores através da amplificação da fosforilação responsável pelo fator de crescimento epidérmico (EGF em inglês) (26, 27).

Em 1995, Groot e colaboradores (28) desenvolveram uma técnica de radioimunoensaio para a determinação sérica do RC-3095 com alta sensibilidade para a monitoriza-

Tabela 1 Inibição pelos antagonistas da bombesina/GRP da ligação de (¹²⁵J)-Tir⁴-bombesina em células suíças 3T3 e H-345 e da incorporação GRP-estimulada de (³H)-timidina para células 3T3.

Peptídeos	ligação K _d (nM)		CI ₅₀ (nM)
	Cels 3T3	NCI H – 345	Cels 3T3
Tir ⁴ -bombesina	0,6	0,5	—
GRP	1,3	1,6	—
RC-3125	10,6	21,0	18
RC-3095	8,0	10,0	10
RC-3420	1,0	4,6	0,8
RC-3105	71,0	22,0	80
RC-3110	1,0	5,0	NT
RC-3400	5,0	30,0	NT

K_d, constante de dissociação de ligantes para receptores. Os resultados de cada experimento de ligação foram calculados de dados a partir de tubos triplicados em um ensaio de 10-2 pontos para células suíças 3T3 e em ensaio de 6-pontos para células NCI H-345. O coeficiente de variação das determinações variaram de 10 a 30%. Os valores de CI₅₀ representam a concentração de peptídeos, causando metade da inibição máxima do crescimento estimulado de 3nM GRP. NT significa não-testado.

ção da droga, facilitando a avaliação clínica e experimental desse antagonista da bombesina/GRP.

2.3 Estudos de toxicidade

2.3.1 Em cães Beagle

Nos laboratórios de Schally (Toxicology Report: data on file; Asta Laboratories, Frankfurt, Germany), realizou-se um estudo de toxicidade do RC-3095 através da administração subcutânea por duas semanas em cães da raça Beagle. O objetivo era obter informação sobre o perfil toxicológico da substância após a administração repetida, diária e subcutânea em não-roedores. Três grupos com dose diferentes (grupos 2-4) e um grupo-controle (grupo 1) foram estudados. Cada grupo era composto de três machos e três fêmeas.

O RC-3095 foi administrado como uma solução aquosa em manitol (0,3 molar) nos grupos 2, 3 e 4 em um volume constante de injeção de 1 ml/Kg de peso. Os cães do grupo 1 receberam uma solução de manitol de 1 ml/Kg de peso (0,3 molar). A variação da dose foi de 0,316 mg/Kg de peso como limite inferior (grupo 2), 0,562 mg/Kg de peso como dose média (grupo 3) e 1 mg/Kg de peso como limite superior (grupo 4).

O comportamento e as condições gerais dos cães não foram alterados durante o período de tratamento. Contudo, os animais mostraram sinais de intolerabilidade nos locais das injeções. Isto ocorreu com a dose máxima em um macho (Nº 19) e em uma fêmea (Nº 22) do grupo 4 na segunda semana e em duas fêmeas do grupo 3 (Nº 16, 17), com dose média, na segunda semana. Os locais das injeções subcutâneas estavam moderadamente edemaciadas devido às propriedades irritantes da substância testada. Nenhum outra evidência clínica foi observada nos grupos tratados ou no grupo-controle, e nenhuma morte ocorreu durante o período de tratamento.

O hábito alimentar dos cães não foi influenciado significativamente durante o estudo, o mesmo ocorrendo com o ganho ponderal dos animais. Outros aspectos clínicos

examinados, como reflexos, condições oftalmológicas e auditivas, dentes, temperatura corporal e frequência cardíaca, também não sofreram alterações.

Tanto os parâmetros de análise hematológica quanto os exames bioquímicos e os de urina não revelaram alterações relacionados ao tratamento. O exame macroscópico não revelou qualquer achado relacionado ao tratamento, com exceção daqueles encontrados nos locais das injeções. Estes mostravam áreas avermelhadas e estavam espessados nos animais tratados. Os casos mais graves eram os dos animais do grupo da maior dose. As fêmeas do grupo 4 de maior dose revelaram uma redução estatisticamente significativa do peso do trato genital tanto absoluto quanto relativo.

O exame macroscópico não mostrou qualquer achado sistêmico relacionado ao tratamento. Os locais das injeções evidenciaram uma incidência aumentada de infiltrados inflamatórios, necrose focal e fibrose, cuja gravidade estava relacionada à dose administrada. Nos animais controle, existiam apenas achados mínimos com alguma hemorragia focal, fibrose/fibroplasia e inflamação, evidências que refletem o caráter traumatizante da administração parenteral.

Os animais dos grupos 2 a 4 também demonstraram infiltrados inflamatórios relacionados à dose administrada. Esses infiltrados variavam, por suas características, de agudos a crônicos. Nos grupos 3 e 4, a inflamação crônica tinha um caráter granulomatoso focal e estava presente ao redor de material eosinofílico (presumivelmente material testado). A lesão aguda apresentava áreas centrais com necrose. Esses achados correlacionavam-se com os achados macroscópicos das áreas espessadas. Todos os outros achados foram considerados como não sendo relacionados ao tratamento e interpretados como lesões comuns observadas em cães jovens da raça Beagle.

Concluiu-se como resultado deste estudo de toxicidade de duas semanas com injeções subcutâneas diárias e repetidas do RC-3095 e cães Beagle, observando-se que o teste da substância não induziu toxicidade específica em uma dose que variou de 0,316 e 1,000 mg/Kg por quilo de peso. Isto ocorreu tanto na avaliação clínica quanto

nos exames clínico-patológicos, inclusive na análise urinária. Os exames macro e microscópicos não revelaram qualquer toxicidade aos órgãos-alvo.

2.3.2 Em ratos Wistar

Nos laboratórios de Schally (Toxicology Report: data on file; Asta Laboratories, Frankfurt, Germany), realizou-se um estudo de toxicidade durante quatro semanas com administração diária subcutânea de RC-3095 em ratos Wistar. Tal estudo foi executado com vistas à obtenção de informação sobre o perfil de toxicidade do RC-3095 após administração diária repetida e ao registro do nível do efeito tóxico não-observável.

A rota de administração subcutânea foi escolhida por ser a mais plausível de aplicação em seres humanos. Quatro grupos de ratos Wistar foram usados no estudo, todos constituídos de 10 machos e 10 fêmeas. Cinco animais adicionais por sexo foram usados exclusivamente para amostragem de sangue nos grupos 1, 2 e 4 para identificar o perfil toxicocinético da substância testada. O RC-3095 foi administrado em uma solução 0,3 molar de D-manitol nos animais dos grupos 2, 3 e 4. Os ratos do grupo 1 receberam solução de manitol a 0,3 molar como animais controle. A dose variou de 0,64 mg/Kg de peso como a menor dose (grupo 2), 1,00 mg/Kg de peso como dose intermediária (grupo 3) e 2,5 mg/Kg de peso como dose máxima (grupo 4).

Durante as quatro semanas de tratamento subcutâneo com RC-3095, não foram observados sintomas clínicos ou mortalidade. Nenhuma influência no consumo alimentar ou no peso corporal foi registrada. O teste de reflexos, o controle de audição, a dentição, os olhos e as investigações oftalmológicas não revelaram quaisquer alterações que pudessem ser atribuídas ao tratamento com o RC-3095. Da mesma forma, não houve alterações dos parâmetros hematológicos nem influência nos parâmetros bioquímicos durante o estudo. Igualmente, não se observaram alterações toxicológicas relevantes na análise urinária que pudessem ser atribuídas ao tratamento.

O exame macroscópico revelou achados relacionados ao tratamento apenas nos locais das injeções em todos os grupos, incluindo os controles. Os locais das injeções

apresentaram rubor focal, hemorragia ou eritema. Alguns animais tratados (grupos 3 e 4) também tenderam a apresentar um leve espessamento no local da injeção. Nenhuma mudança absoluta ou relativa de peso dos órgãos foi observada nos ratos em qualquer grupo.

Os achados microscópicos relacionados ao tratamento estavam presentes apenas nos locais da injeção. Todos os animais, incluindo os controles, tinham hemorragias focais de grau mínimo a moderado, fibrose/fibroplasia focal, necrose focal e infiltrados celulares inflamatórios agudos ou crônicos. Os animais tratados tenderam a apresentar uma gravidade desses achados relacionada à dose administrada, bem como a ocorrência de granulomas focais tipo corpo estranho ao redor de pequenos depósitos focais de um material eosinofílico amorfo (substância testada).

Portanto, durante o estudo de toxicidade de quatro semanas com administração subcutânea de RC-3095 em ratos Wistar, não se observou nenhum sintoma clínico relevante ou mortalidade. Os parâmetros patológicos clínicos e o peso dos órgãos também não foram influenciados pelo tratamento. Os achados relacionados ao tratamento estavam presentes exclusivamente nos locais das injeções. Estes ocorreram tanto nos animais tratados quanto nos controles. Tal fato reflete o caráter traumatizante de injeções subcutâneas repetidas. A extensão e a gravidade desses achados foram limitados, o que se correlaciona bem com a excelente tolerância clínica do material testado.

Concluiu-se, com base no presente estudo de toxicidade em ratos Wistar, que o teste com a substância RC-3095 é bem tolerado no modelo proposto. A não-observância de efeitos tóxicos ocorreu nas doses mais altas de 2,5 mg/Kg de peso em administrações diárias repetidas. A aplicabilidade de doses mais elevadas ficou limitada pela baixa solubilidade aquosa do material testado no volume de administração máximo diário injetável.

2. 4 Estudos experimentais em tumores

2.4.1 Câncer pulmonar de pequenas células (CPPC)

Em 1978, Wharton e colaboradores publicaram que a bombesina/GRP foi detectada no epitélio bronquial e bronquiolar de células humanas (29). Níveis significativos podem ser detectados nos pulmões de fetos recém-nascidos, conforme demonstraram Yamagushi e colaboradores (30). Assim, Carney e colaboradores sugeriram que, na árvore pulmonar, a bombesina/GRP desempenha um importante papel na função e no desenvolvimento pulmonar fetal (31).

Em 1981, Moody e colaboradores demonstraram que linhagens de células de CPPC humanas produzem bombesina/GRP (32) e, posteriormente, que muitas linhas celulares de CPPC apresentam na superfície alta afinidade por receptores bombesina/GRP (33).

Como já foi referido, em 1985, Cuttitta e colaboradores (12) publicaram que peptídeos bombesina-similares podem funcionar como fatores de crescimento autócrinos em CPPC humano, ou seja, as células do CPPC produzem e secretam peptídeos bombesina-similares que interagem com receptores específicos de membrana na sua própria superfície celular, induzindo, assim, a proliferação celular. Esse mecanismo levaria a uma alça de retroalimentação: a célula cancerosa estimularia o seu próprio crescimento. Para interromper tal mecanismo, foram testados anticorpos e antagonistas da bombesina/GRP. Demonstrou-se, ainda, que um anticorpo monoclonal para a bombesina (2A11) liga-se à região C-terminal dos peptídeos bombesina-similares e bloqueia a ligação do peptídeo com seu receptor. Conseqüentemente, a inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* podiam ser observadas.

Em um estudo posterior, Layton e colaboradores (34) demonstraram que antagonistas do GRP inibiam o crescimento celular em CPPC *in vitro*. Em 1988, Trepel e colaboradores evidenciaram que o RC-3095 provocava a inibição da formação de colônias *in vitro* (35). No ano seguinte, Mahmoud e colaboradores (36) demonstraram que o mesmo

antagonizava a estimulação de crescimento clonal em linhagens de células do CPCP causados por bombesina exógena adicionada.

Finalmente, em 1991, foi publicado pelo mesmo grupo que o RC-3095 também inibia o crescimento de xenotransplantes de CPCP *in vivo*, na dose de 10 µg/animal/dia no tecido subcutâneo adjacente ao nódulo tumoral por cinco semanas, com redução do volume tumoral de 50% (37).

O grupo de Schally testou o RC-3095 para aferir a capacidade do mesmo para inibir *in vivo* o crescimento de uma linhagem celular do CPPC humano. Camundongos atímicos com xenotrasplantes de células H-128 de CPPC humanos foram tratados por cinco semanas com esses compostos em diferentes doses. Houve uma redução significativa do crescimento tumoral após duas semanas de administração de RC-3095 em uma dose diária de 20 µg/animal e, no final do tratamento, a redução do crescimento tumoral foi de cerca de 70% comparativamente ao grupo-controle, bem como a redução da concentração de receptores bombesina/GRP na membrana dos tumores (38).

No ano seguinte, Koppan e colaboradores realizaram um experimento semelhante em células H-69 de CPPC, com dose de 10 µg/animal/dia, tendo observado uma redução do volume tumoral de aproximadamente 50%, uma redução da concentração de receptores bombesina/GRP na membrana dos tumores de 29% e de 62,3% nos níveis de EGF (39).

2.4.2 Câncer de pâncreas

Em 1985, Lhoste e colaboradores (40, 41) publicaram que a administração prolongada de bombesina induziria a hipertrofia e a hiperplasia das células pancreáticas. Damge e colaboradores (42) evidenciaram que tanto a bombesina quanto o GRP eram equipotentes no efeito trófico do pâncreas de rato.

Em 1988, Avis e colaboradores (43) publicaram que a bombesina e o GRP podiam estimular as células do câncer do pâncreas exógeno. Esse achado foi confirmado posteriormente por outros estudos, como o de Jaworek e colaboradores (44).

Tabela 2 Efeito do tratamento com o antagonista da bombesina/GRP RC-3095 em animais sobreviventes, peso do pâncreas e peso do pâncreas tumoral em hamsters com câncer de pâncreas induzido por nitrosamina.

Grupo	Nº de animais falecidos durante o tratamento	Nº total de animais com carcinoma (histologia)	Peso do pâncreas (g)	Peso do pâncreas tumoral (g)	% da inibição do peso do pâncreas tumoral
Controle	2/12	12/12	4,32 ± 2,75	4,32 ± 2,75	0
RC-3095 20 µg/dia	0/10	6/10 ^a	0,52 ± 0,08 ^a	0,56 ± 0,12 ^a	86,9
RC-160 150 µg/dia	1/12	7/12 ^a	0,46 ± 0,04 ^a	0,49 ± 0,06 ^a	88,6
RC-160 30 µg/dia	2/12	10/12	1,05 ± 0,30	1,18 ± 0,35	72,7
[D-Trp ⁶]LH-RH	1/12	9/12	0,87 ± 0,12	1,01 ± 0,12	76,6
RC-160II 30 µg/dia	3/12	9/12	1,03 ± 0,23	1,20 ± 0,28	72,1

Valores de peso expressos em ± erro padrão.

^ap < 0,05.

Szepeshazi e colaboradores testaram o RC-3095, tendo em vista a possibilidade do envolvimento da bombesina/GRP no desenvolvimento de câncer pancreático induzido por nitrosamina em hamsters (45, 46, 47). No primeiro experimento, o RC-3095 foi administrado via bombas de infusão osmótica em uma dose diária de 20 µg/animal por oito semanas. Ao final desse experimento, aferiu-se o peso do pâncreas e realizou-se a diferenciação entre tecido normal e tumoral baseada na respectiva histologia (Tabela 2).

O peso do pâncreas tumoral foi significativamente reduzido em 87% comparado ao grupo-controle. A incidência de tumor foi reduzida em animais tratados com o RC-3095 (6/10) comparativamente ao grupo-controle (12/12). O estudo de receptores (Tabela 3) mostrou que não houve redução da regulação de receptores da bombesina nos tumores pancreáticos após o tratamento com RC-3095, embora tenha sido observada redução da regulação de receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGF).

Estudos mais recentes, como o de Qin e colaboradores, confirmaram o efeito inibitório do RC-3095 na proliferação de células cancerosas pancreáticas humanas (48,49). Szepeshazi e colaboradores, analisando hamsters com câncer pancreático induzido por nitrosamina e tratados com 20 µg/dia desse agente por oito semanas, observaram uma

Tabela 3 Características dos sítios de ligação da bombesina e do EGF em membranas de câncer de pâncreas induzidos por nitrosamina de hamsters, após tratamento *in vivo* com o antagonista da bombesina RC-3095.

Tratamento	Bombesina		EGF	
	Constante de dissociação (K_d , nM)	Capacidade máxima de ligação B_{max} , fmol/mg	Constante de dissociação (K_d , nM)	Capacidade máxima de ligação B_{max} , fmol/mg
Grupo-controle	1,39 ± 0,81	305 ± 35	0,9 ± 0,23	77,16 ± 14,9
RC-3095	3,27 ± 0,66	283 ± 48	0,13 ± 0,12 ^a	14,89 ± 5,3 ^b
RC-160	—	—	0,2 ± 0,1 ^a	18,10 ± 12,6 ^a

Valores expressos em erro padrão médio de experimentos de deslocamento em tubos triplicados.

^ap < 0,01; ^bp < 0,0001.

EGF = Fator de crescimento epidérmico.

acentuada redução (71%) dos EGF que voltavam aos níveis prévios dias após a suspensão do tratamento (50). Da mesma forma, Alvaro-Alonso e colaboradores tiveram resultados semelhantes em ratos Wistar (51).

2.4.3 Tumores gastrointestinais

Em 1986, Singh e colaboradores (52) descreveram que a proliferação das células colorretais normais é um processo gastrina-dependente e que a proliferação de tumores gástricos e colorretais também pode ser influenciada pela gastrina. No mesmo ano, os estudos experimentais de Kusyk e colaboradores (53) demonstraram que baixas doses de gastrina estimularam o crescimento de linhas celulares LoVo do câncer de cólon.

Em 1988, Tache e colaboradores demonstraram que o GRP estimulava a liberação do hormônio gastrointestinal enteropancreático e dos fatores de crescimento epitelial intestinal e pancreático (54). Em 1990, Narayan e colaboradores (55) descreveram a presença de receptores específicos para peptídeos bombesina/GRP- similares em linhas celulares de câncer de cólon MC-26. Anteriormente, Smith e colaboradores publicaram que a linha de células humanas de câncer de cólon HT-29 apresentava receptores de gastrina (56) e, um ano após, Watson demonstrou que a gastrina estimulava o crescimento dessas células *in vitro* e *in vivo* em xenotransplantes (57).

Culouscou (58) detectou que essa linha de células secreta os fatores de crescimento epidérmico. Posteriormente, Radulovic e colaboradores (59) realizaram um experimento em camundongos atímicos com xenotransplantes de linha de células humanas de câncer de cólon HT-29, os quais foram tratados por 27 dias com o antagonista da bombesina RC-3095 em dose diária de 20 µg administradas por duas injeções subcutâneas por dia ou por infusão contínua através de minibombas osmóticas. O crescimento tumoral foi reduzido significativamente em 55% (injeções 2 x sc) ou em 41% (bombas osmóticas). Ao final do tratamento, a administração via bombas osmóticas resultou na redução de 36% nos valores do peso tumoral e as injeções subcutâneas em uma inibição de 49%.

Esses achados foram confirmados pelo mesmo grupo em em estudo posterior (60).

Alguns estudos experimentais posteriores, como o de Halmos e colaboradores (61), confirmaram a presença de receptores para bombesina/GRP em membranas gástricas humanas. Outros, como os de Pinski e colaboradores (62) e de Quin e colaboradores (63), demonstraram que o RC-9035 inibe, *in vitro* e *in vivo*, o crescimento do câncer gástrico humano.

2.4.4 Câncer de mama

Em 1984, Jahnke e Lazarus (64) detectaram imunorreatividade similar à bombesina em leite de vaca, e Ekman e colaboradores (65) confirmaram a mesma reatividade em leite humano. Em 1988, Sunday (66) reportaram o mesmo achado no epitélio de glândula mamária bovina. Em 1986, Gaudino e colaboradores (67) já haviam identificado imunorreatividade em tumores mamários experimentais de ratos.

Em 1985, Sainsbury e colaboradores(68) publicaram que o EGF tinha um importante papel no desenvolvimento e na progressão do câncer de mama. A inibição tumoral de câncer pancreático de hamsters induzido por nitrosamina e em xenotransplantes células HT-29 de cólon em camundongos atímicos, que fora descrita por Szepeshazi e colaboradores e por Radulovic e colaboradores (69, 70), estava associada a uma importante redução da regulação de receptores EGF.

Igualmente, Yano e colaboradores evidenciaram a existência de receptores bombesina/GRP em tumores humanos de mama (71). Shirahige e colaboradores, por sua vez, demonstraram que os antagonistas bombesina/GRP – inclusive o RC-3095 – produziam redução na regulação de receptores de EGF no crescimento tumoral (72).

Posteriormente, Szepeshazi e colaboradores testaram em três experimentos o efeito do RC-3095 em carcinomas de mama estrógeno-dependentes em ratos (73). Contrariamente aos tumores não estrógeno-dependentes, não foram detectados receptores de EGF naqueles tumores. Os animais foram tratados por 33 dias com uma dose diária de 20 µg administrados por bombas osmóticas. Ao final do tratamento, o crescimento tumoral fora inibido em 63%, tendo o volume tumoral como parâmetro, e o peso tumoral em 58%.

Da mesma forma, Schally e seu grupo (Schally, comunicação pessoal) testaram o RC-3095 no que se refere à inibição de xenotransplantes de câncer de mama humano MDA-MB-231 em camundongos atímicos. O crescimento tumoral foi inibido em cerca de 83% após quatro semanas de tratamento. Em outro experimento, realizado por Yano e colaboradores (74), camundongos atímicos com xenotransplantes de câncer de mama humano da linha MCF-M7III foram tratados por sete semanas com RC-3095, administrados por via subcutânea em dose diária de 20 µg. Houve redução de 58% no volume tumoral final e de 48% no peso tumoral.

Miyazaki e colaboradores, estudando o efeito inibidor do RC-3095 em doses de 10 µg/animal/dia por cinco semanas sobre linhagens de células MDA-MB-231 de câncer de mama humano, observaram uma redução de 57,7% do volume e também de peso tumoral (75). Recentemente, Kahan e colaboradores realizaram um estudo semelhante em tumores de mama tipo MDA-MB-468 com importante supressão do crescimento tumoral (76).

2.4.5 Câncer de próstata

Schally e seu grupo testaram o RC-3095 em várias linhas celulares de tumores de próstata humanos devido ao fato de as mesmas secretarem EGF e peptídeos similares e exibirem respostas a eles. Adicionalmente, tem sido demonstrado que algumas delas

Tabela 4 Efeito do tratamento com RC-3095 no peso de tumor prostático humano andrógênio-independente DU-1435, em camundongos.

Grupo tratado	volume tumor (mm ³)		peso corporal (g)	peso tumor (mg)	tempo duplicação tumor (dias)
	inicial	final			
Controle	7,2 ± 1,4	111 ± 14,0	24,0 ± 1,2	78,4 ± 10,2	11,2 ± 1,7
RC-3095	10,2 ± 2,4	85,3 ± 7,3*	24,8 ± 1,0	57,3 ± 5,3**	14,3 ± 1,2

Valores são médias ± desvio padrão.

* p < 0,05; **p < 0,01.

possuem receptores para bombesina/GRP e que a proliferação dessa linha de células pode ser estimulada pela bombesina *in vitro*, conforme demonstrado no estudo de Bologna e colaboradores (77).

O RC-3095 foi administrado por meio de bombas osmóticas em dose de 100 mg/dia em ratos portadores do adenocarcinoma prostático andrógênio-independente anaplásico de Dunning R-3327-AT-1 (78). O RC-3095 reduziu significativamente o crescimento do tumor entre os dias 7 e 15 (Tabela 4), não ocorrendo o mesmo após esse período. O efeito antagonista à bombesina foi acompanhado de uma completa redução de receptores de bombesina/GRP; porém, contrariamente a outros experimentos, não foram detectadas alterações na capacidade de ligação do EGF. Estudos mais recentes confirmaram a inibição do crescimento de tumores humanos de próstata pelo RC-3095 (79, 80, 81,82, 83).

2.4.6 Outros tumores

Estudos têm mostrado que o RC-3095 inibe o crescimento de células de glioblastoma humano. Pinski e colaboradores, investigando o efeito desse antagonista da bombesina/GRP sobre o crescimento de linhagens de células de glioma maligno humano em camundongos, evidenciaram uma redução dos volumes tumorais de até 79% (84). Kiaris e colaboradores obtiveram uma redução de cerca de 60% dos volumes tumorais após a administração de RC-3095, durante quatro semanas, em camundongos (85).

Kozacko e colaboradores reportaram que a administração do RC-3095 em hamsters submetidos a incisões bucais com laser de CO₂ em células malignas implantadas apresentaram uma total interrupção do desenvolvimento dos tumores. A descontinuidade do uso desse agente coincidia com a retomada da progressão das lesões. Os autores concluíram, então, que o RC-3095 eliminava a liberação de fatores de crescimento tumoral e poderia prevenir o desenvolvimento desse tipo de câncer induzido (86). Kingsbury e colaboradores confirmaram achados semelhantes posteriormente (87).

Em recente estudo, Chatzistamou e colaboradores (88) publicaram os resultados de estudo sobre os efeitos do RC-3095 no crescimento de carcinoma de ovário humano, em doses de 20 µg/dia, em camundongos. Reportaram uma redução de 47,7% do volume tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a segurança e a viabilidade do uso do RC-3095 em pacientes portadores de tumores sólidos avançados.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Realizar um estudo confirmatório em roedores dos dados toxicológicos já existentes quanto à segurança do uso do RC-3095 no esquema de administração a ser aplicado nos estudos clínicos de Fase I em pacientes com tumores sólidos.

3.2.2 Realizar estudo clínico de Fase I com o RC-3095 no esquema de administração recomendado em estudos toxicológicos prévios em pacientes com tumores sólidos refratários, visando aos seguintes objetivos:

- a) Determinar o perfil e a reversibilidade dos efeitos tóxicos do RC-3095 na população estudada.

- b) Identificar toxicidades dose-limitantes ao uso do RC-3095 em seres humanos.
- c) Determinar a Dose Máxima Tolerada (DMT) e, se possível, uma Dose Modulatória Ótima (DMO) do RC-3095 no mesmo estudo.
- d) Estudar o efeito do RC-3095 nos níveis plasmáticos de gastrina nos pacientes incluídos no estudo.
- e) Recomendar uma dose segura do RC-3095 para ser aplicada em estudos clínicos de Fase II.
- f) Documentar a ocorrência de efeitos antitumorais do RC-3095 na população estudada.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WORKMAN, P., D' INCALCI, BERDEL, W.E. *et al.* New approaches in cancer pharmacology; drug design and development. *Eur. J. Cancer*, 28:1190-1200, 1992.
2. SIKORA, S., ADVANI, V., KOROLTCHOUK, I. *et al.* Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Annals of Oncology*, 10:185-190, 1999.
3. SCHWARTSMANN, G., WORKMAN, P. Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a european perspective. *Eur. J. Cancer*, 29:3-14, 1993.
4. SCHWARTSMANN, G., WINOGRAD, B., PINEDO, H.M. The main steps in the development of new anticancer agents. *Radiotherapy and Oncology*, 12:301-313, 1988.
5. ANASTASI, A., ESPARMER, V., BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experimentia*, 27:166-167, 1971.
6. McDONALD, T.J., NILSON, G., VAGNE, M., BLOOM, S.R., MUTT, V.A. gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut*, 19:767-774, 1978.
7. RADULOVIC, S., CHAI, R.Z., SERFOZO, P. *et al.* Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin /GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 38:593-600, 1991.
8. PINSKI, J., YANO, T., GROOT, K. *et al.* Endocrine effects of new bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists in rats. *Am. J. Physiol.*, 263 (4Pt 1): E712 – 7, 1992.
9. LEBACQ-VERHAYDEN, A.M., TREPEL, J., SAUSVILLE, E.A., BATTEY, J.F. Bombesin and gastrin-realising peptide: neuropeptides, secretogogues, and growth factors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 95/II: Chapter 21.
10. BROCCARDO, M., ERSPARMER, G.F., MELCHIORRI, P., DE CASTIGLIONE, R. Relative potency of bombesin-like peptides. *Br. J. Pharmacol.*, 55:221-227, 1975.

11. PINSKI, J., YANO, T., SCHALLY, A. V. Inhibitory effects of new bombesin receptor antagonist RC-3095 on the luteinizing hormone release in rats. *Neuroendocrinology*, 56:831-837, 1992.
12. CUTTITTA, F., CARNEY, D.N., MULSHINE, J. *et al.* Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature*, 316:823-836, 1985.
13. SIEGFRIED, J.M., KRISHNAMACHARY, N., GAITHER D.A. *et al.* Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm. Pharmacol Ther.*, 12:291-302, 1999.
14. YOSHIDA, T., KUNITO, H., SAIJO, N. Growth factor and signal transduction in lung cancer cell. *Nippon Rinsho*, 58:1023-1030, 2000.
15. GOKHALE, J.A, JONES-BLACKETT, S., PRESTON, S.R., FARMERY, S.M., PRIMROSE, J.N. Bombesin and gastric cancer: effects on cellular proliferation and signalling (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 36:A1538, 1995.
16. GUGGER, M., REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am. J. Pathol.*, 155: 2067-2076, 1999.
17. BOLD, R.J., ISHIZUKA, J., YAO, C.Z., TOWNSEND, C.M. JR., THOMPSON, J.C. Bombesin stimulates in vitro growth of human breast cancer independent of estrogen receptors status. *Anticancer Res.*, 18: 4051-4056, 1998.
18. WANG, Q.J., KNEZETIC, J.A., SCHALLY, A.V., POUR, P.M., ADRIAN, T.E. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int. J. Cancer*, 68:528-534, 1996.
19. HAN, K., CHEVALIER, S, VIALLET, J., BAZINET, M., APRIKIAN, A.G. Bombesin induced signal transduction in androgen-insensitive human prostate cancer cells (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 36:A247, 1995.
20. MARKWALDER, R., REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.*, 59:5, 1152-1159, 1999.
21. SUN, B., HALMOS, G., SCHALLY, A.V., WANG, X., MARTINEZ, M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*, 42:295-303, 2000.
22. SAURIN, J.C., NÉMOZ, G.E., SORDAT, B. *et al.* Bombesin stimulates adhesion, spreading, lamellipodia formation, and proliferation in the human colon carcinoma Isreco1 cell line. *Cancer Res.*, 59:962-7, 1999.
23. CHAVE, H.S., GOUGH, A.C., PALMER, K., PRESTON, S.R., PRIMROSE, J.N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br. J. Cancer*, 82:124-130, 2000.
24. CAI, R.Z., REILE, H., ARMATIS, P., SCHALLY, A.V. Potent bombesin antagonists with C-terminal Leu-psi (CH₂-N)-Tac-NH₂ or its derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1264-1268, 1994.

25. SASAKI, Y., COY, D.H. *Peptides*, 8:119-121, 1978.
26. LIEBOW, C., CREAN, D.H., LEE, M. T. *et al.* Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3804-3808, 1994.
27. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., HALMOS, G.A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94: 1013-1018, 1997.
28. GROOT, K., HORVATH, J.E., CAI, R.Z., SCHALLY, A.V. Development of a radioimmunoassay for a pseudonanapeptide bombesin/GRP antagonist with antitumor activity. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 45:561-566, 1995.
29. WHARTON, J., POLAK, J.M., BLOOM, S.R. Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature*, 273:769-770,1978.
30. YAMAGUCHI, K., ABE, K., KAMEYA, T. Production and molecular size heterogeneity immunoreactive gastrin-releasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. *Cancer Res.*, 43:3932-3939, 1983.
31. CARNEY, D.N., CUTTITTA, F., MOODY, T. W., MINNA, J.D. Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res.*, 47:821-825, 1987.
32. MOODY, T.W., PERT, C.B., GAZDAR, A. F., CARNEY, D.N., MINNA, J.D. High levels of bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science*, 214:1246-1248, 1981.
33. MOODY, T.W., BEERTNESS, V., CARNEY, D.N. Bombesin-like peptides and receptors in human tumor cell lines. *Peptides*, 4:683-686, 1983.
34. LAYTON, J.E., SCANLON, D.B., SOVENY, C., MORSTYN, G. Effects of bombesin antagonists on the growth of small cell lung cancer cells in vitro. *Cancer Res.*, 48:4783-4789, 1988.
35. TREPEL, J.B., MOYER, J.D., CUTTITTA, F. *et al.* A novel bombesin receptor antagonist inhibits autocrine signals in a small cell lung carcinoma cell line. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 156:1383-1389,1988.
36. MAHMOUD, S., PALASZKI, E., FISKUM, G., COY, D.H., MOODY, T.W. Small cell lung cancer bombesin receptors are antagonized by reduced peptide bond analogues. *Life Sci.*, 44:367-373, 1989.
37. MAHMOUD, S., STALEY, J., TAYLOR, J. *et al.* (Psi^{13, 14}) bombesin analogues inhibit growth of small cell, lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 51:1798-1802, 1991.
38. HALMOS, G., SCHALLY, A.V. Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Feb 4, 94:956-960, 1997.
39. KOPPAN, M., HALMOS, G., ARENCIBIA, J.M., LAMHARZI, N., SCHALLY, A.V. Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H – 69 small cell lung carcinoma. *Cancer*, 83: 1335-1343, 1998.

40. LHOSTE, E., APRAHAMIAN, M., POUSSE, A., HOELTZEL, A, STOCK-DAMGE, C. Combined effect of chronic bombesin and secretin or cholecystokinin on the rat pancreas. *Peptides* (Suppl. 3), 6:83-87, 1985.
41. LHOSTE, E., APRAHAMIAN, M., POUSSE, A., HOELTZER, A., STOCK-DAMGE, C. Trophic effect of bombesin on the rat pancreas : is it mediated by the release of gastrin or cholecystokinin? *Peptides* (Suppl. 3), 6:89-97, 1985.
42. DAMGE, C., HAJRI, A., LHOSTE, E., APRAHAMIAN, M. Comparative effect of chronic bombesin, gastrin-releasing peptide and caerulein on the rat pancreas. *Regul. Pept.*, 20:141-150, 1988.
43. AVIS, F.P., MANECKJEE, R., CUTTITTA, F. *et al.* The role of gastrin-releasing peptide in a pancreatic tumor cell line (CAPAN). *Proc. AACR*, 29:54, 1988.
44. JAWOREK, J., KONTUREK, P. K., KONTUREK, S. J., CAI, R. Z., SCHALLY, A.V. Actions of novel bombesin receptor antagonists on pancreatic secretio in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 214:239-245, 1992.
45. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., CHAI, R.Z. *et al.* Inhibitory effect of bombesin/GRP antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analog RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. *Cancer Res.*, 51:5980-5986, 1991.
46. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., GROOT, K., HALMOS, G. Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP) (14-27) and bombesin/GRP antagonist RC-3095 on growth of nitrosamin-induced pancreatic cancers in hamsters. *International Journal of Cancer*, 54(2):382-389, 1993.
47. SZEPEHAZI, K., HALMOS, G., SCHALLY, A.V. Combination treatment of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters with analogs of LH-RH and a bombesin/GRP antagonists. *Int. J. Pancreatol.*, 16:141-149, 1994.
48. QIN, Y., ERTL, T., CAI, R.Z., HALMOS, G., SCHALLY, A.V. Inhibitory effect of bombesin antagonist RC-3095 o the growth of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 54:1035-1041, 1994.
49. QIN, Y., ERTL, T., CAI, R.Z. *et al.* Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW -1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP. *Int. J. Cancer*, 63:257-262, 1995.
50. SZEPEHAZI, K., HALMOS, G., SCHALLY, A.V. *et al.* Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptors during therapy with hormonal peptide analogs. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:444-452, 1999.
51. ALVARO-ALONSO, I., MUNOZ-ACEDO, G., RODRIGUEZ-MARTIN, E., SCHALLY, A.V., ARILLA, E. Bombesin induces a reduction of somatostatin inhibition of adenylyl cyclase activity, Gi function, and somatostatin receptors in rat exocrine pancreas. *Peptides*, 20:723-730, 1999.

52. SINGH, P., WALKER, J.P., TOWNSEND, C.M., THOMPSON, J.C. Role of gastrin and gastrin receptors on the growth of a transplantable mouse colon carcinoma (MC-26) in BALB/c mice. *Cancer Res.*, 46:1612-1616,1986.
53. KUSYK, C.J., McNIEL, N.O., JOHNSON, L.R. Stimulation of growth of a cancer cell line by gastrin. *Am. J. Physiol.*, 251:G597-601, 1986.
54. TACHE, Y., MELCHIORRI, P., NEGRI, L. Bombesin-like peptides in health and disease. *New York Academy of Sciences*, 1988.
55. NARAYAN, S., GUO, Y.S., TOWNSEND, C.M., SINGH, P. Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cell vitro. *Cancer Res.*, 50:6772-6778,1990.
56. SMITH, J.L., SOLOMON,T.E. Effects of gastrin, proglumide, and somatostatin on growth of human colon cancer. *Gastroenterology*, 95:1541-1548, 1988.
57. WATSON, S.A., DURRANT, L.G., MORRIS, D.L. Gastrin: growth enhancing effects on human gastric and colonic tumor cells. *Br. J. Cancer*, 59:554 -558, 1989.
58. CULOUSCOU, J.M., REMACLE-BONNET, M., GARROSTE, F., MARVALDI, J. POMMIER, G. Simultaneous production of IGF-I and EGF competing growth factors by HT-29 human colon cancer cell line. *Int. J. Cancer*, 40:646-652, 1987.
59. RADULOVIC, S., MILLER, G., SCHALLY, A.V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res.*, 51:6006-6009, 1991.
60. RADULOVIC, S., SCHALLY, A. V., REILE, H. *et al.* Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somastostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human coloncancers in nude mice. *Acta Oncol.*, 33:693-701, 1994.
61. HALMOS, G., PINSKI, J., SZOKE, B., SCHALLY, A.V. Characterization of bombesin/ gastrin-releasing peptide receptors in membranes of MKN45 hima gastric cancer. *Cancer Lett.*, 85:111-118, 1994.
62. PINSKI, J., HALMOS, G., YANO, T. *et al.* Inhibition of growth of MKN45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/ gastrin antagonist (RC-3095) and somastostatin analogue RC-160. *Int. J. Cancer*, 57:574-580, 1994.
63. QIN, Y., HALMOS, G., CAI, R.Z. *et al.* Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120:519-528, 1994.
64. JAHNKE, G.D., LAZARUS, L.H. A bombesin immunoreactive peptide in milk. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81:578-582, 1984.
65. EKMAN, E., IVARSSON, S., JANSSON, L. Bombesin, neurotensin, and proopiomelanotropin immureactants in human milk. *Regul.Peptides*, 10:99-104, 1985.
66. SUNDAY, M.E., KAPLAN, L.M., MOTOYAMA, E., CHIN, W.W., SPINDEL, E.R. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab. Invest.*, 59:5-24, 1988.

67. GAUDINO, G., DEBORTOLLI, M., LAZARUS, L.H. A bombesin-related peptide experimental mammary tumors in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 464:450-453, 1986.
68. SAINSBURY, J.R.C., FARNDON, J.R., SHERBET, G.V., HARRIS, A.L. Epidermal factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. *Lancet*, i:363-366, 1985.
69. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., CAI, R.Z., RADLOVIC, S., SZOKE, B. Inhibitory effect of bombesin/GRP antagonist RC-3095 and high dose somatostatin analog RC-160 on nitrosamine-induced cancers in hamsters. *Cancer Res.*, 51:5980-5986, 1991.
70. RADULOVIC, S., MILLER, G., SCHALLY, A.V. Inhibition of growth of HT-human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/GRP antagonist (RC-3095). *Cancer Res.*, 51:6006-6009, 1991.
71. YANO, T., PINSKI, J., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Stimulation by bombesin and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, 52:4545-4547, 1992.
72. SHIRAHIGE, Y., CAI, R.Z., SZEPEHAZI, K. *et al.* Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3095-II and RC-3095 on MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in nude mice. *Biomed. Pharmacother.*, 48: 465-472, 1994.
73. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., GROOT, K., RADULOVIC, S. Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen independent MTX mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84:1951-1922, 1992.
74. YANO, T., PINSKI, J., SZEPEHAZI, K. *et al.* Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF-7MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer*, 73:1229-1238, 1994.
75. MIYAZAKI, M., LAMHARZI, N., SCHALLY, A.V. *et al.* Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095. *Eur. J. Cancer*, 34:710-717, 1998.
76. KAHAN, Z., SUN, B., SCHALLY, A.V. *et al.* Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast carcinoma by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II. *Cancer*, 88:1384-1392, 2000.
77. BOLOGNA, M., FESTUCCIA, C., MUZI, P., BIORDI, L., CIOMEI, M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*, 63:1714-1720, 1989.
78. PINSKI, J., REILE, H., HALMOS, G., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Inhibitory effects of somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-327-AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res.*, 54: 169-174, 1994.

79. MILOVANOVIC, S.R., RADULOVIC, S., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Inhibition of growth of PC-82 human prostate cancer line xenografts in nude mice by bombesin antagonist RC-3095 or combination of agonist [D-Trp6] – luteinizing hormone-releasing hormone and somatstatin analog RC-160. *Prostate*, 20:269-280, 1992.
80. PINSKI, J., HALMOS, G., SCHALLY, A.V. Somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of androgen-independent DU-145 human prostate cancer line in nude mice. *Cancer Lett.*, 71:189-196, 1993.
81. PINSKI, J., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V. Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptides as adjuncts to agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in the treatment of experimental prostate cancer. *Cancer*, 72:3263-3270, 1993.
82. PINSKI, J., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K. Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC-3 human prostate cancer xenografts in nude mice. *Int. J. Cancer*, 55:963-967, 1993.
83. REILE, H., ARMATIS, P.E., SCHALLY, A.V. Characterization of high-affinity receptors of bombesin/gastrin-releasing peptide on human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound ¹²⁵I – (Tyr4) bombesin by tumor cells. *Prostate*, 25:29-38, 1994.
84. PINSKI, J., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K., GROOT, K. Somatostatin analogues and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 54: 5895-5901, 1994.
85. KIARIS, H., SCHALLY, A.V., SUN, B., ARMATIS, P., GROOT, K. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene*, 25, 18:7168-7173, 1999.
86. KOZACKO, M.F., MANG, T.S., SCHALLY, A.V., PRIORE, R.L., LIEBOW, C. Bombesin antagonist prevents CO₂ laser-induced promotion of oral cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93:2953-2957, 1996.
87. KINGSBURY, J.S., CECERE, W., MANG, T.S., LIEBOW, C. Photodynamic therapy for premalignant lesions in DMBA – treated hamsters: a preliminary study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 55: 376-381, 1997.
88. CHATZISTAMOU, I., SCHALLY, A.V., SUN, B., ARMATIS, P., SZEPEHAZI, K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br. J. Cancer*, 83: 906-913, 2000.

**Confirmatory Animal Toxicological Study and The First Phase I
Trial of The Bombesin-Like Antagonist RC-3095 in Patients with
Advanced Solid Tumors: Study Discontinuation Due to the
Occurrence of Formulation Problems***

Postgraduate Course in Medicine
Federal University of Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brazil.

* Submitted to publication in Investigational New Drugs.

ABSTRACT

Following an initial confirmatory safety study in mice and rats, the author describe a phase I trial of the new bombesin-like antagonist RC-3095 in patients with advanced solid tumors. The starting dose of RC-3095 was 8 µg/weight once daily and the dose was escalated to 16 and 32 µg/Kg once daily in consecutive groups of 3 patients with no toxicity. Following a protocol amendment, the dose was further escalated to 64 and 96 µg/Kg/weight daily (divided in twice daily administrations). RC-3095 was administered to the patients as a bolus subcutaneous injection in cycles of 21 consecutive days. Toxicity was evaluated using to the NCI Common Toxicity Criteria, while tumor responses were graded using the WHO criteria. So far, fifteen patients were included in the phase I trial. Patients had a median of 55 years (range, 32-80), male/female ratio 6/9, median performance status 1 of 4 (range 0-3), 11 had previous chemotherapy, 11 surgery, 6 radiotherapy, 4 hormone therapy, 1 immunotherapy for the following tumor types: 2 colorectal, 2 renal, 2 pancreas and 2 breast carcinomas, 1 prostate carcinoma, 1 small cell lung cancer, 1 squamous cell carcinoma of the esophagus, 1 medullary adenocarcinoma of the thyroid, 1 malignant melanoma (choroid), 1 malignant fibrohistiocyoma and 1 malignant schwannoma (thigh). All patients had to sign a written informed consent prior to study entry. A total of 40 treatment courses were evaluable for toxicity and response, with a median of 2 courses per patient (range 1-5). No significant toxic effects were observed so far in the study, apart from occasional mild pain a the injection site. One minor regression was documented in a patient with medullary carcinoma of the thyroid which lasted for 12 weeks. Formulation problems became a limiting factor for the continuation of the study at the completion of dose escalation level five (96 mg/Kg). The trial was therefore discontinued to allow further formulation studies to circumvent the above mentioned problem.

INTRODUCTION

Although cytotoxic therapy has changed dramatically the curability of various types of cancer, specially in children and young adults, a similar impact was not observed in most advanced tumors of adulthood (1). Therefore, there is an urgent need for new active therapeutic agents, specially those acting through more tumor-specific pathways (2). By having a low selectivity for the cancer cell, classical cytotoxic agents usually possess a narrow therapeutic index, producing significant side-effects at the therapeutic dose ranges, besides the presence of mutations that confer resistance to these agents (3).

Over the last years, the role of autocrine and/or paracrine growth-stimulatory factors has been clearly demonstrated in various murine and human tumors. The identification of these mechanisms creates the opportunity for the development of more selective treatments against tumors, through substances that can block this stimulation pathways specifically in malignant cells (4). Using small-cell lung carcinoma cell lines, Moody and cols. have shown the expression of high-affinity bombesin-like cell surface receptors (5,6). Furthermore, Cuttitta and cols. have confirmed the role of bombesin-like growth factors in this tumor, suggesting that this autocrine pathway could be critical for the maintenance of tumor growth in that model (7).

Bombesin is a 14-aminoacid peptide which was initially isolated by Anastasi and cols. from the skin of the frog *Bombina bombina* (8). bombesin was shown to possess various biological effects, specially in the gastrointestinal tract and in the central nervous system. It is structurally related to the gastrin-releasing peptide (GRP), which was initially isolated from gastric tissue in pigs (9). bombesin-like peptides were shown to have a stimulatory effect on the release of growth hormone (GH) and luteinising hormone (LH) through specific receptors present in the central nervous system (10,11).

The chemical structure of bombesine and GRP is shown in Figure 1.

Over the last decade, various studies have documented the occurrence of growth stimulatory effects of bombesin-like peptides in experimental tumors (12, 13, 14, 15, 16).

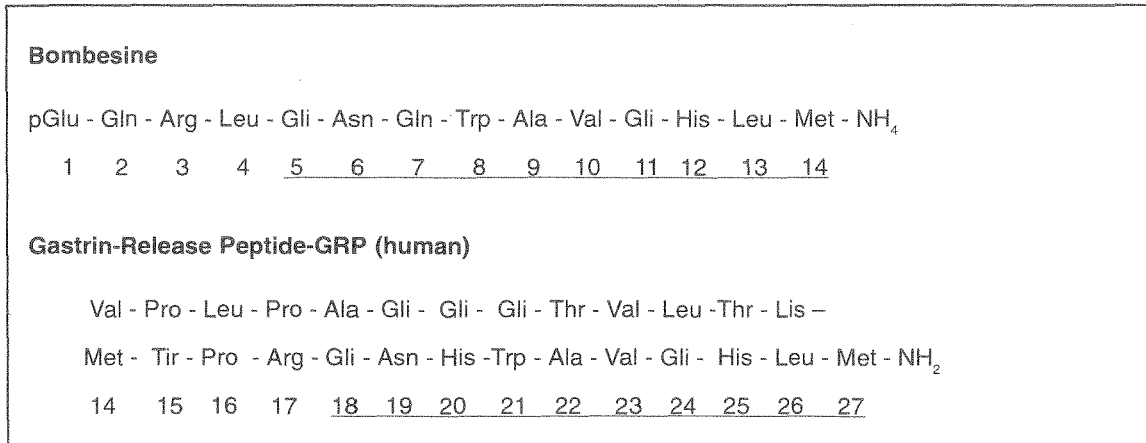


Figure 1 Chemical structure of RC-3095 and the Gastrin-Releasing Peptide (GRP).

Recently, more studies were published about this subject (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). These observations have clearly confirmed the autocrine and/ or paracrine properties of bombesin-like peptides in both murine and human tumors suggested by Cuttitta and cols. in 1985 (7).

Furthermore, the use of bombesin antagonists was associated with the production of objective tumor regressions and even cures in certain human tumors, such as small-cell lung (25, 26, 27, 28) pancreatic (29, 30, 31), gastrointestinal (32, 33, 34), breast (35, 36, 37), prostatic (38, 39) and other types of tumors (40, 41) implanted as xenografts in murins.

The above mentioned observations have led some investigators to consider the evaluation of the therapeutic potential of bombesin-like antagonists in the clinic (42). For that purpose, Schally and cols. have synthesized a series of bombesine-like analogues, of which RC-3095 have shown a favorable preclinical profile. RC-3095 was able to significantly inhibit tumor growth in various cancer models and its antitumour activity *in vitro*, as well as in animal experimentation.

Toxicological studies of RC-3095 given as a daily subcutaneous injection failed to show any significant adverse effects, apart from some local irritation at the injection site. Considering that no maximum tolerated dose (MTD) was observed in animal studies

(RC-3095 was administered subcutaneously to rats and beagles up to the doses of 1.0 and 2.5 mg/Kg, respectively), the starting dose for human trials was based on a dose level that produced objective responses in tumor-bearing mice studies (32) and that was around 8 µg/Kg given once daily for 21 consecutive days.

In this report, the authors present additional data confirming the lack of significant toxicity of RC-3095 in mice and rats receiving the dose and schedule of this agent that was chosen to start the first Phase I trial of RC-3095 in patients with advanced solid tumors. Thereafter, the data obtained from the first series of patients included in the trial is presented. Unfortunately, the study was prematurely discontinued due to precipitation of the RC-3095 solution at the highest dose levels. This problem is now being circumvented by modification in its formulation for clinical use.

MATERIAL AND METHODS

a) Design of the animal studies

Balb-C mice (males) were obtained at 6-8 weeks of age from the animal breeding station of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. They were used between 3-6 months of age and kept in an area of standardized light-dark cycle in the same facility. Mice were randomized in 2 groups, a control arm with 10 mice receiving 0.9% saline solution and one treatment arm divided in four sub-groups A,B, C and D of 10 mice each receiving RC-3095 in different dosages. Saline or RC-3095 were administered by subcutaneous daily injection for 21 days at similar volume and conditions. The treatment sub-groups A, B, C and D received daily doses of RC-3095 of 8, 16, 32 and 64 µg/Kg, respectively. All animals were fed according to the standard routine of the animal facility and were kept in individual cages with 10 animals each. The animals were inspected daily for signs of any abnormal behavior in the cage and/or signs of clinical toxicity. In case of lethality, the investigator was instructed to separate the organs (liver, gut, hearth, brain, lung and spleen) and prepare it for pathological examination.

For additional experiments, Wistar rats (adults) were obtained from the animal facility at the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul and transported to the same facility and conditions described above. Controls (10 rats) received 0.9% saline, while treated animals (sub-groups A and B with 10 rats each) received RC-3095 at the lowest and highest doses applied in mice experiments (8 and 64 µg/Kg daily for 21 consecutive days, respectively).

b) Design of the Phase I Clinical Study

Once the safety of starting dose of RC-3095 was confirmed, the Phase I trial in patients with advanced and refractory solid tumors was initiated. This was a non-randomized phase I study, in which consecutive patients received RC-3095 with the observation of an interval of at least one week between trial entry. Groups of 3-5 patients will be entered at each dose level; with no intra-patient dose-escalation.

Doses were escalated initially by 100%, as no toxic effects were observed in preclinical toxicology studies. If clinical toxicity appeared, dose escalation would follow a modified Fibonacci scale. At the toxic levels, a larger number of patients would be accrued, in order to establish the maximum tolerated dose (MTD). Thereafter, a dose level below the MTD (15-20% lower) would be evaluated in an additional series of patients to determine a recommended dose for Phase II trials.

In parallel, measurements of serum gastrin levels were to be determined in same patients, aiming at its utilization as a surrogate marker of a RC-3095 anti-bombesin effect. As both gastrin and bombesin share a high homology of sequences, gastrin release can be potentially inhibited by RC-3095 and the inhibition of gastrin release may indicate a biologically meaningful dose of RC-3095 in humans.

c) Inclusion criteria for the Phase I Clinical Study

Patients should fulfill all of the following criteria: histologically-proven diagnosis of a solid tumor, such as small cell lung cancer (in this case, a positive cytology was also

acceptable), pancreatic cancer, colon cancer, breast cancer or prostate cancer; clinical progression of the disease; life expectancy greater than three months; performance status 0-3 (WHO); liver function tests and bilirubin within two times the upper limit of normal range; blood counts within normal limits: leukocytes $> 4.0 \times 10^9 / l$, Platelets $> 100 \times 10^9 / l$, hemoglobin $> 6.8 \text{ mmol} / l$; serum creatinine, 1,2 mg / dl; no evidence of active uncontrolled infection; stable chronic disease; absence of mental illness; cancer with no conventional treatment available or in which conventional has failed; informed consent from the patient and expected cooperation for treatment and follow up.

d) Exclusion criteria for the Phase I Clinical Study

The following exclusion criteria were used : patients with known CNS disease; pregnancy or lactation; serious concomitant physical or psychiatric disease which would jeopardize the study or the patient's tolerance of the treatment and treatment with drugs affecting bone marrow function which cannot be discontinued.

e) Pretreatment and follow-up studies

Prior to the start of each treatment course (not longer than 7 days), patients had to undergo a complete history and physical examination, performance status evaluation, assessment of measurable lesions (when available), complete blood cell counts and urinalysis. Serum chemistry included electrolytes, total protein, albumin, glucose, bilirubin, alkaline phosphatase, γ GT, SGOT, SGTP, lactic dehydrogenase, creatinine and uric acid. An EKG and a chest X – ray was done. Complete blood counts was repeated at least twice weekly; serum chemistry every week; EKG and chest X – ray every three weeks. Performance status and toxicity (WHO) was evaluated at weekly intervals.

f) Dose escalation procedure and toxicity evaluation

RC-3095 was obtained from Asta Pharmaceuticals, Germany, as standard vials for subcutaneous administration by as a freeze-dried preparation. The agent was reconstituted in sterile water for injection USP. Reconstituted vials were maintained in 4° centigrades and administered to the patients subcutaneously daily for 21 consecutive days. The starting dose was 8 µg/Kg body weight administered by one subcutaneous injection daily for three weeks. Treatment was to be continued in the absence of evidence of disease progression.

At least three patients were included per dose level. Dose escalation in individual patients was not allowed. The dose was given once daily and escalated by 100% in each group of patients in dose levels I, II and III. Dose levels IV and V included a 50% dose escalation and a twice daily administration. This dose escalation procedure was planned thereafter on the basis of a modified Fibonacci scheme (dose escalation of 50%, 33% and 25%, respectively) until the maximum tolerated dose (MTD) or an optimal modulatory dose (OMP) was reached.

If dose-limiting toxicity (meaning a dose level that caused severe and life-threatening toxic effects) was observed at a given dose level, additional patients were included in that dose level (at least 5 patients) to further evaluate these effects. The MTD was defined as the dose in which limiting toxicity was observed at a given dose level in 3 or more of the 5 patients. The OMD meant a dose of RC-3095 which would cause plasma gastrin levels to drop at least 50% from baseline levels. For patients receiving RC-3095 at tolerable dose levels (no grade 4 toxicity), courses were repeated at the same dose level at the completion of three-week interval.

The aims of the study were to define the pattern of toxicity, dose-limiting toxicities (DLT), MTD and/ or an OMD and the establishment of a recommended dose for Phase II trials. Toxicities were scored according to the NCI Common Toxicity Criteria (NCI-CTC). DLT was defined as at least one of the following events: a) ANC (absolute neutrophil

count) of < 500/UL for > 7 days or associated with fever exceeding 38° C; b) platelet count of < 25.000/ul; or c) grade 3-4 mucositis, nausea and vomiting and/or diarrhea.

Once the MTD was reached, further groups of patients would be treated at a reduced dose level (about 20% reduction) in order to determine the recommended dose for phase II studies. The suggested dose for phase II trial was defined as a dose below the MTD that displayed reversible toxicity and could be considered tolerable to the patients by the investigators upon repeated courses.

g) Measurements of gastrin levels in plasma

Five ml of heparinized blood for plasma preparations were obtained immediately before drug administration, at 1, 2, 8 and 24 hours, as well as weekly after drug administration. The samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The separated plasma was transferred to plastic tubes identified by the patient name, the date and time of blood collection. The plasma was stored at -20C until analysis. Gastrin levels were measured by radio-immune-assay (RIA) at the Biochemical Section, Laboratório Faillace, Porto Alegre, Brazil. For the Phase I study, a dose of RC-3095 that could produce at least a 50% decrease in plasma gastrin levels in relation to its baseline in the same patient was considered as an evidence of a biological effect.

h) Ethical considerations

This study protocol was submitted to the Ethical and Scientific Committee of HCPA, as well as to the Ministry of Health of Brazil, as well as the Scientific Department of the sponsor, for their approval. All study entry procedures and decisions were taken in accordance with the Brazilian law and international ethical and scientific recommendations.

The responsible physician had to inform the patient about the background and present knowledge of the drugs under study with special reference to known activity and toxicity. It was emphasized that the patient was allowed to refuse the treatment at any time during

the study. Before the patient was entered into the study, a written informed consent was obtained according to Good Clinical Practice (GCP) recommendations. The principal investigator had to ensure that the study was being carried out in agreement with the declaration of Helsinki and it had obtained the approval by the local Ethical Committee and the governmental regulatory authorities.

i) Statistical considerations

In this Phase I trial, the methodology of study were based on the standard guidelines published by NCI, EORTC and CRC for clinical testing of new anticancer agents in humans. Only procedures considered acceptable by international institutions on the basis of ethics and proper scientific conduct were applied.

RESULTS

a) Animal studies

The results of mice toxicological studies in the control and treatment group are summarized In Table 1. There were no detectable changes in behavior, activity or weight between the groups. One animal died in the control group at day 18. No lethality was observed in the treatment sub-groups. Two animals were removed from sub-group B due to technical problems during drug administration at days 8 and 13.

Considering that no lethality nor significant toxic effect were observed in our mice studies, confirming the full animal toxicology report (described in details in the review section), pathological examination of the animals was not performed. In order to confirm the safety profile of RC-3095, similar studies were performed in rats using the planned starting dose for human studies of 8 µg/Kg/day as well as the maximum dose level applied in mice, i.e., 64 µg/Kg/day.

Table 1 Summarized results of confirmatory toxicology studies of RC-3095 in mice.*

Type of effect	Behavior	Local	Hair loss	Piloerection	Weight loss	Lethality
Control (n=10) (0.9% saline)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
<i>RC-3095**</i> (n=10 per sub-group)						
A (8 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
B (16 µg/Kg)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
C (32 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D (64 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

* No statistical differences between control and treated animals.

** Daily treatment for 21 consecutive days.

Table 2 Summarized results of confirmatory toxicology studies of RC-3095 in rats.*

Type of effect	Behavior	Local	Hair loss	Piloerection	Weight loss	Lethality
Control (n=10) (0.9% saline)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
<i>RC-3095**</i> (n=10 per sub-group)						
A (8 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
B (64 µg/Kg)	0/10	1/10#	0/10	0/10	0/10	0/10

* No statistical differences between control and treated animals.

** Daily treatment for 21 consecutive days.

Slight irritation and edema at the injection site that disappeared thereafter with no scar or residual lesion.

The results of rat studies are therefore presented in Table 2. Again, no cases of lethality were observed in the study groups. The only abnormality observed was a slight irritation and edema at the injection site in one animal of the treated sub-group B around days 6-7, that recovered spontaneously thereafter. The animal was maintained on treatment for the 21-day period with no detectable toxic effects.

b) The Phase I trial

Once the safety of the starting dose of RC-3095 was again confirmed in mice and rats, we initiated a phase I trial in patients with advanced solid tumors, in which the toxicity profile, DLT, MTD, OMD (if possible) and the recommended doses for phase II trials of RC-3095 had to be defined. The characteristic of patients entered on the study are listed in Table 3. Fifteen patients were included, representing the spectrum of refractory solid tumors usually seen in the participating institutions. There were 6 males and 9 females, with a median age of 60 years (range 32-80). The median WHO performance status was 1 (range 0-3). Tumor types were 7 adenocarcinomas (colon 2, kidney 2, pancreas 2 and prostate 1), 2 invasive ductal carcinoma (breast), 1 small cell lung cancer, 1 squamous cell carcinoma (esophagus), 1 medullary adenocarcinoma (thyroid) 1 malignant melanoma (choroid), 1 malignant fibrohistiocytoma (gluteus) and 1 malignant schwannoma (thigh).

Table 3 Characteristics of patients included in the Phase I trial.

Type	Number of patients
Male/female	6/9
Median age	60 (32-80)
Median WHO Performance status	1 (0-3)
Tumor types	
Breast	2
Colon	2
Kidney	2
Pancreas	2
Esophagus	1
Lung	1
Thyroid	1
Prostate	1
Malignant melanoma	1
STS*	2
Prior therapy	
Surgery	11
Chemotherapy	11
Radiotherapy	6
Immunotherapy	1
Hormone therapy	4

*STS: Soft Tissue Sarcoma.

Eleven patients had chemotherapy, 11 surgery, 6 radiotherapy, 4 hormonotherapy and 1 immunotherapy.

A total of 40 treatment courses were administered, with a median of 2 (range 1-5) courses per patient. RC-3095 was administered to consecutive groups of patients as a subcutaneous injection at five different dose levels. Dose levels I, II and III were of 8, 16 and 32 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ once daily. A protocol amendment was decided following the completion of patient accrual at the totally non-toxic dose levels I, II and III. RC-3095 was then escalated using a twice-daily administration in dose levels IV and V, following observation in the laboratory that the interaction of RC-3095 with bombesin-like receptors in various tumor models was more favorable in terms of autocrine growth-stimulatory effect inhibition when given more frequently to tumor-bearing mice (Schally AV, personal communication). Therefore, dose levels IV and V were of 64 and 96 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (total dose) given in divided doses twice daily, respectively. Each course of RC-3095 meant a daily treatment for 21 consecutive days. The dose escalation administered in this study is shown in Table 4.

Up to dose level V, the only hematological toxicity observed was anemia, which was probably disease-related (Table 5). Mild anorexia, fatigue and pain at the injection site were also observed in some cases (Table 6). No cases of DLT were documented and the MTD was not yet reached at that dose level.

Notably, one minor tumor regression was documented in a patient with the diagnosis of metastatic medullary carcinoma of the thyroid who was treated at dose level III. The patient was a woman of 72 years-old who developed multiple pulmonary and liver

Table 4 Dose escalation levels in the Phase I trial.

Dose level	RC-3095 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
I	8
II	16
III	32
IV	64 (32 twice daily)
V	96 (48 twice daily)

Table 5 NCI-CTC Maximum Graded Toxicities for All Cycles.

Dose level	I	II	III	IV	V
Number of patients	3	3	3	3	3
Number of courses	12	7	7	5	9
Anemia (%)					
Grade 3	0	0	0	1	1
Grade 4	8	0	0	1	1

NCI-CTC = National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria

Table 6 NCI-CTC Graded Toxicities for All Cycles in the Phase I trial.

(N = 15 PTS; 40 cycles)

	Nº	%
Anemia		
Total	6	15.0
Grade 1-2	3	7.5
Grade 3	1	2.5
Grade 4	2	5.0
Pain (%)		
Total	9	22.5
Grade 1-2	9	22.5
Grade 3	0	0
Grade 4	0	0
Anorexia (%)		
Total	7	17.5
Grade 1-2	7	17.5
Grade 3	0	0
Grade 4	0	0
Fatigue (%)		
Total	5	12.5
Grade 1-2	5	12.5
Grade 3	0	0
Grade 4	0	0
Pain at injection site (%)		
Total	4	10
Grade 1-2	4	10
Grade 3	0	0
Grade 4	0	0

PTS = Patients.

NCI-CTC = National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria.

metastasis and failed Interferon-alpha and somatostatin-analogue therapy. She had a reduction of about 30% in the product of the diameter of measurable lesions in both lung and liver. She reported a marked improvement in her shortness of breath following about 4 weeks from starting therapy. The duration of the response was of 12 weeks. Unfortunately, she then progressed in the liver and treatment was discontinued. The remaining patients showed clinical progressive disease after 1-2 treatment courses.

Plasma gastrin levels were measured in 11 out of the 15 patients included in the study and agreed to participate in that part of the study. The analysis of plasma gastrin levels failed to demonstrate any significant changes from basal levels following RC-3095 administration. Unfortunately, no plasma was collected from the patient with medullary carcinoma of the thyroid who had a minor tumor regression following RC-3095 administration. The reason for refusal was because the patient was very symptomatic and confined to bed and the family specifically requested the avoidance of repeated blood sampling.

The planned dose level VI represented again a 50% dose escalation, i.e., RC-3095 was to be given at the dose of 144 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ divided in 72 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ twice daily administrations. Unfortunately, formulation problems were observed during preparation at our pharmacy department. The solution was easily precipitating following its standard dissolution in water. The use of a larger volume was also considered inadequate because it could cause local pain and irritation. In consequence, the Phase I trial of RC-3095 was temporarily discontinued and the compound was sent back to the laboratory for further formulation tests.

DISCUSSION

RC-3095 is the first bombesin-like antagonist to enter clinical trials. The decision to bring this agent into clinical development was based on its novel mechanism of action, impressive antitumor activity in preclinical models, including small cell lung cancer, breast,

prostate and gastrointestinal tumors of human origin implanted as xenografts in nude mice, as well as the lack of toxicity of this compound in animal toxicology studies (4,7). Similarly, the choice of the route, schedule of administration and starting dose of RC-3095 for human studies was based on several studies performed in animal models (36,37,38).

Considering that this agent was going to be tested for the first time in humans, we decided to initially confirm the animal toxicology data that suggested a totally non-toxic profile of this agent. Therefore, we performed a series of experiments in mice and rats in the dose range of the recommended dose to initiate Phase I trials. The results of our confirmatory toxicological studies in Balb-C mice and Wistar rats gave support to previous observations that RC-3095 is indeed devoid of any detectable toxic effect when administered to mice and rats subcutaneously, in our case, for 21 consecutive days.

When our Phase I trial of RC-3095 was being planned, it became also clear to us that the classical methodology of Phase I trials, in which toxicity is used to guide the identification of the DLT, the MTD, and the recommended dose for additional studies, might not be appropriate for the study of a compound like RC-3095. In fact, this compound differs significantly from the classical cytotoxic agents commonly used in cancer therapy, because it is not cytotoxic to the normal tissues, and exerts its antitumor effect through the inhibition of a tumor-dependent growth-factor stimulatory mechanism (25).

Therefore, we decided to add to the standard Phase I methodology the measurements of plasma gastrin levels in the patients. The rationale for that was that RC-3095 inhibits bombesin-like receptors in tumor cells, and that would also potentially interfere with GRP receptors in various tissues. As gastrin release is dependent on GRP stimulation, the measurement of plasma gastrin levels in patients receiving RC-3095 in the Phase I trial could be potentially used as a surrogate marker of its biological effect (43).

That might also provide us an opportunity to maybe stop the Phase I trial when an OMD, meaning a dose that produces significant inhibition of gastrin levels in plasma, would be identified. This strategy was considered of extreme importance in this study,

because of the risk that the dose escalation of a non-toxic compound such as RC-3095 could lead to a non-realistic high number of dose escalation steps and no MTD observed. The variability of gastrin plasmatic levels could explain the fact that no inhibition was found with RC-3095. We plan, in the next step of this study, a GRP stimulation in order to get a more adequate gastrin measure.

Our results so far confirm that RC-3095 is indeed a non-toxic compound also for humans. Following the detailed evaluation of its potential toxic effects in the first series of 15 patients, distributed in five different dose levels, no clinically relevant toxicity was observed. The limiting factor, however, for the continuation of the study was on its formulation for human use. As this compound is being injected twice daily subcutaneously in a total maximum volume of 2-3 ml of sterile water for 21 consecutive days in each treatment cycle, higher dose levels of RC-3095 would demand a larger volume of the diluent. That was considered unpractical in terms of the logistics of the study. In addition, it caused precipitation rapidly after dilution in volumes up to 3 ml of sterile water. That would certainly cause discomfort, pain or local irritation at the injection site. Therefore, it was decided to stop temporarily the trial and bring it back to the laboratory for the development of a new formulation.

The observation of a tumor regression in one patient with advanced refractory medullary carcinoma of the thyroid, which was also associated with relief of clinical symptoms is also of importance. Although this tumor type is not clearly associated with the expression of bombesin-like cell membrane receptors, it certainly stimulates us to continue the study and look more deeply into this condition. There is no form of systemic therapy for this disease that is clearly effective or is able to produce gain in patient overall survival. Therefore, we look forward to the inclusion of additional patients with this diagnosis in the study.

We are very enthusiastic in having documented signs of a biological effect of RC-3095 in the above mentioned patient, because that suggests we might be reaching meaningful dose levels for the achievement of antitumor effects. Hopefully, similar positive

effects may be observed within this dose range in the future, specially in patients with tumor types such as small-cell lung cancer, as there is a clear rationale for the use of RC-3095 in these patients whose tumors were shown to express bombesin-like receptors (5).

The field of growth-factor receptor antagonists as potential anticancer therapies is still in its infancy. There is a large number of publications that illustrate the strong interest of the scientific community in bombesin-like receptor physiology and the therapeutic use of its antagonists.

Siegfried and cols. (44), for example, based on the fact that Gastric-Releasing Peptide (GRP) has mitogenic activity in small cell lung carcinoma (SCLC) and that it is produced by SCLC cells, demonstrated that GRP is also a autocrine growth factor for non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), they have detected GRP receptors expressed in various NSCLC cell lines. By immunoblotting using SDS-PAGE gradient gels fixed in trichloroacetic acid, GRP was found in fractions of culture medium that had been purified by high pressure liquid chromatography (HPLC) from NSCLC cell lines. These results suggest that GRP are autocrine growth factors for NSCLC.

In another study, Sun and cols. (45) investigated the presence and characteristics of the functional receptors for bombesin/GRP in human prostate adenocarcinoma specimens by radio-receptor assay and the mRNA expression of the three bombesin receptor subtypes by RT-PCR. They found that approximately 63% showed high-affinity, low-capacity binding sites for bombesin/GRP, and some of the receptor-positive specimens also showed a second binding site. The authors concluded that the detection of a wide distribution of bombesin/GRP receptors in human prostate carcinomas supports the view that they may be involved in modulation of tumor progression and suggests that approaches based on binding of bombesin receptor antagonists or new targeted cytotoxic bombesin analogs to prostate cancers could be considered for the therapy.

Chatzistamou and cols. (46) investigated the effects RC-3095 on the growth of human ovarian carcinoma cell line OV-1063, xenografted into nude mice. RC-3095 at a dose of

20 mug per day reduced the volume of OV-1063 tumors by 47.7%. They concluded that these results indicate that antagonists of bombesin/GRP inhibit the growth of OV-1063 ovarian cancers by mechanisms that probably involve the downregulation of c-jun and c-fos proto-oncogenes.

Finally, Kiaris and cols. (47) evaluated the effects of RC-3095 on the growth of human malignant glioblastoma cell line U-87MG xenografted into nude mice. RT-PCR analysis showed that U-87MG xenografts expressed mRNA for bombesin receptor subtype BRS-1 (GRP receptor) and BRS-2 (neuromedin-B receptor), but the mRNA for GRP ligand was not detected in U-87MG cells suggesting that GRP may stimulate the growth of U-87MG glioblastomas by a paracrine mechanism. The levels of mRNA for c-fos oncogene were decreased by 30-40% in U-87MG tumors treated with RC-3095. In U-373MG glioblastoma cells, which also express BRS-1, and U-87MG cells, cultured *in vitro*, GRP induced the expression of c-fos mRNA, and some c-jun mRNA, in a time-dependent manner with the maximal effect occurring 2 h after the stimulation and a return to basal levels after 8 h. The authors concluded that these results indicate that antagonists of bombesin/GRP inhibit the growth of U-87MG glioblastomas by a mechanism that may involve the downregulation of c-fos oncogene.

As observed from the above mentioned studies, the list of human tumor types for which a rationale to the experimental use of RC-3095 was established is expanding tremendously. Therefore, we look forward to the reactivation of our Phase I trial in patients with advanced solid tumors and to the identification of a biologically meaningful dose of RC-3095 to be recommended for Phase II trials in patients with several types of cancer.

REFERENCES

1. WORKMAN, P. D'INCALCI, Berdel, W.E., *et al.* New approaches in cancer pharmacology; drug design and development. *Eur J Cancer*, 28:1190-1200, 1992.
2. SIKORA, S., ADVANI, V., KOROLTCHOUK, I., *et al.* Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Annals of Oncology*, 10:185-190, 1999.

3. SCHWARTSMANN, G., WORKMAN, P. Anticancer Drug Screening and Discovery in the 1990s: A European Perspective. *Eur. J. Cancer*, 29: 3-14, 1993.
4. SCHWARTSMANN, G., WINOGRAD, B., PINEDO, H.M. The main steps in the development of new anticancer agents. *Radiotherapy and Oncology*, 12:301-313, 1988.
5. MOODY, T.W., PERT, C.B., GAZDAR, A.F, CARNEY, D. MINNA, J.D. High levels of bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science*, 214: 1246-1248, 1981.
6. MOODY, T.W., BEERTNESS, V., CARNEY, D.N. Bombesin – like peptides and receptors in human tumor cell lines. *Peptides*, 4:683-686, 1983.
7. CUTTITTA, F., CARNEY, D.N., MULSHINE, J., *et al.* Bombesin – like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature*, 316:823-836, 1985.
8. ANASTASI, A., ESPARMER, V., BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experimentia (Basel)*, 27:166-167, 1971.
9. MCDONALD, T.J., NILSON, G., VAGNE, M., BLOOM, S.R., MUTT, V.A. Gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut*, 19:767-774, 1978.
10. PINSKI, J., YANO, T., GROOT, K., *et al.* Endocrine effects of new bombesin / gastrin-releasing peptide antagonists in rats. *Am J Physiol*, 263 (4Pt 1): E712-717, 1992.
11. PINSKI, J., YANO, T., SCHALLY, A.V. Inhibitory effects of new bombesin receptor antagonist RC-3095 on the luteinizing hormone release in rats. *Neuroendocrinology*, 56: 831-837, 1992.
12. AVIS, F.P., MANECKJEE, R., CUTTITTA, F., *et al.* The role of gastrin releasing peptide in a pancreatic tumor cell line (CAPAN). *Proc. AACR*, 29:54, 1988.
13. DAMGE, C., HAJRI, A., LHOSTE, E., Aprahamian, M. Comparative effect of chronic bombesin, gastrin-releasing peptide and caerulein on the rat pancreas. *Regul Pept*, 20:141-150, 1988.
14. KUSYK, C.J., MCNIE, N.O., JOHNSON, L.R. Stimulation of growth of a cancer cell line by gastrin. *Am J Physiol*, 251:G597-601, 1986.
15. NARAYAN, S., GUO, Y.S., TOWNSEND, C.M., SINGH, P. Specific binding and growth effects of bombesin – related peptides on mouse colon cancer cell vitro. *Cancer Res*, 50:6772-6778, 1990.
16. SAINSBURY, J.R.C., FARNDON, J.R., SHERBET, G.V., HARRIS, A.L. Epidermal factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. *Lancet I*: 363-366, 1985.
17. GUGGER, M., REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol*, 155:2067-2076, 1999.
18. WANG, Q.J., KNEZETIC, J.A., SCHALLY, A.V., POUR, P.M., ADRIAN, T.E. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int J Cancer*, 68:528-534, 1996.

19. HAN, K., CHEVALIER, S., VIALLET, J., BAZINET, M., APRIKIAN, A.G. Bombesin induced signal transduction in androgen-insensitive human prostate cancer cells (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc. Cancer Res*, 36:A247, 1995.
20. YOSHIDA, T., KUNITO, H., SAIJO, N. Growth factor and signal transduction in lung cancer cell Nippon Rinsho, 58: 1023-1030, 2000.
21. SAURIN, J.C., NÉMOZ Gaillard, E., SORDAT, B. Bombesin stimulates adhesion, spreading, lamellipodia formation, and proliferation in the human colon carcinoma Isreco1 cell line. *Cancer Res*, 59: 962-967, 1999.
22. CHAVE, H.S., GOUGH, A.C., PALMER, K., PRESTON, S.R., PRIMROSE, J.N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa *Br J Cancer*, 82:124-130, 2000.
23. BOLD, R.J., ISHIZUKA, J., YAO, C.Z., TOWNSEND, C.M. Jr, THOMPSON, J.C. Bombesin stimulates in vitro growth of human breast cancer independent of estrogen receptors status. *Anticancer Res*, 18: 4051-4056, 1998.
24. MARKWALDER, R., REUBI, J.C. Gastrin – releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res*, 59:5, 1152-1159, 1999.
25. MAHMOUD, S., STALEY, J., TAYLOR, J., BOGDEN, A., MOREAU, J.P., COY, D., AVIS, I., CUTTITTA, F., MULSHINE, J.L., MOODY, T.W. (Psi^{13,14}) bombesin analogues inhibit growth of small cell , lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 51:1798-1802, 1991.
26. LAYTON, J.E., SCANLON, D.B., SOVENY, C., and MORSTYN, G. Effects of bombesin antagonists on the growth of small cell lung cancer cells in vitro. *Cancer Res*. 48: 4783-4789, 1988.
27. TREPEL, J.B., MOYER, J.D., CUTTITTA, F., FRUCHT, H., COY, D.H., NATALE, R.B., MULSHINE, J. L., JENSEN, R.T., SAUSVILLE, E.A. A novel bombesin receptor antagonist inhibits autocrine signals in a small cell lung carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 156:1383-1389,1988.
28. MAHMOUD, S., PALASZKI, E., FISKUM, G., COY, D.H., MOODY, T.W. Small cell lung cancer bombesin receptors are antagonized by reduced peptide bond analogues. *Life Sci*. 44:367-373, 1989.
29. SZEPESHAZI, K., HALMOS, G., SCHALLY, A.V., *et al*. Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor receptors during therapy with hormonal peptide analogs. *J Cancer Res Clin Oncol*, 125: 444-452, 1999.
30. ALVARO-ALONSO, I., MUNOZ-ACEDO, G., RODRIGUEZ-MARTIN, E., SCHALLY, A.V., ARILLA, E. Bombesin induces a reduction of somatostatin inhibition of adenylyl cyclase activity, Gi function, and somatostatin receptors in rat exocrine pancreas. *Peptides*, 20:723-730, 1999.
31. QIN, Y., ERTL, T., CAI, R.Z., HORVATH, J.E., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Antagonists of bombesin / gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW-1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP. *Int. J. Cancer* 63: 257-262, 1995.

32. RADULOVIC, S., SCHALLY, A.V., REILE, H., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K., GROOT, K., MILOVANOVIC, S., MILLER, G., YANO, T. Inhibitory effects of antagonists of bombesin / gastrin releasing peptide (GRP) and somastostatin analog (RC-160) on growth of HT – 29 human coloncancers in nude mice. *Acta Oncol* 33: 693-701, 1994.
33. PINSKI, J., HALMOS, G., YANO, T., *et al.* Inhibition of growth of MKN45 human gastric – carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin / gastrin antagonist (RC-3095) and somastostatin analogue RC-160. *Int J Cancer*, 57: 574 - 580, 1994.
34. QIN, Y., HALM, G., CAI, R.Z., *et al.* Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. *J Cancer Res. Clin Oncol*, 120: 519-528, 1994.
35. KAHAN, Z., SUN, B., SCHALLY, A.V., *et al.* Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen – independent human breast carcinoma by bombesin / gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II. *Cancer*, 88: 1384-1392, 2000.
36. YANO, T., PINSKI, J., SZEPEHAZI, K., *et al.* Inhibitory effect of bombesin / gastrin releasing peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF – 7MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer*, 73:1229-1238, 1994.
37. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., *et al.* A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10913-10918, 1997.
38. PINSKI, J., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K. Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin / gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC – 3 human prostate cancer xenografts in nude mice. *Int J Cancer*, 55: 963 -967, 1993.
39. PINSKI, J., REILE, H., HALMOS, G., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Inhibitory effects of somatostatin analog RC – 160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R- 327- AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res.* 54: 169-174, 1994.
40. PINSKI, J., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K., GROOT, K. Somastostatin analogues and bombesin / gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 54: 5895-5901, 1994.
41. KOZACKO, M.F., MANG, T.S., SCHALLY, A.V., PRIORE, R.L., LIEBOW, C. Bombesin antagonist prevents CO2 laser – induced promotion of oral cancer. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 93: 2953-2957, 1996.
42. CAI, R.Z., REILE, H., ARMATIS, P., SCHALLY, A.V. Potent bombesin antagonists with C-terminal Leu – psi (CH2- N)-Tac-NH2 or its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12664-12668, 1994.

43. PINSKI, J., YANO, T., REKASI, Z., *et al.* High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. *Regul Pept*, 41:3, 185-193, 1992.
44. SIEGFRIED, J.M., KRISHNAMACHARY, N., GAITHER, Davis A., *et al.* Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm Pharmacol Ther*, 12:291-302, 1999.
45. SUN, B., HALMOS, G., SCHALLY, A.V., WANG, X., MARTINEZ, M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*, 42(4):295-303, 2000.
46. CHATZISTAMOU, I., SCHALLY, A.V., SUN, B., ARMATIS, P., SZEPEHAZI, K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer*, 83: 906-913, 2000.
47. KIARIS, H., SCHALLY, A.V., SUN, B., ARMATIS, P., GROOT, K. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin – releasing peptide. *Oncogene*, 25; 18:7168-7173, 1999.

Estudo toxicológico confirmatório com o antagonista de receptores do tipo Bombesina, RC-3095, em roedores e o primeiro estudo de fase I em pacientes com tumores sólidos avançados: interrupção temporária do estudo devido a problemas de formulação*

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

Os autores descrevem um estudo de Fase I do RC-3095, um novo antagonista da bombesina, em pacientes com tumores sólidos avançados. A dose inicial do RC-3095 foi de 8 µg/Kg de peso e escalonada em grupos consecutivos de, no mínimo, 3 pacientes até a dose diária de 96 µg/Kg. O RC-3095 foi administrado através de injeções em bolo subcutâneas diárias em ciclos consecutivos de 21 dias. A toxicidade foi avaliada utilizando-se o Critério Comum de Toxicidade do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (Anexo I) e a resposta tumoral de acordo com os Critérios de Resposta Tumoral da Organização Mundial de Saúde (Anexo II). Até o presente, 15 pacientes foram incluídos neste estudo de Fase I. A mediana de idade dos pacientes foi de 60 anos (variação de 32 a 80 anos), a razão de pacientes homens/mulheres foi de 6/9, a mediana do estado de desempenho foi 1 de 4 (variação de 0-3), 11 tinham quimioterapia prévia, 11 cirurgia, 6 radioterapia, 4 hormonioterapia e 1 imunoterapia para os seguintes tumores: 7 adenocarcinomas (côlon 2, rim 2, pâncreas 2 e próstata 1), 2 carcinomas invasivos ductais (mama), 1 carcinoma de pequenas células (pulmão), 1 carcinoma epidermóide (esôfago), 1 adenocarcinoma medular (tireóide), 1 melanoma maligno (coróide), 1 fibrosarcoma maligno e 1 Schwannoma maligno (partes moles). Todos os pacientes assinaram um consentimento informado antes do estudo (Anexo III). Um total de 40 ciclos foram considerados válidos para avaliação de toxicidade e resposta, com uma mediana de 2 ciclos por paciente (variação de 1-5). Não foi observado qualquer efeito tóxico significativo até o presente, apenas dor leve no local da injeção em 4 pacientes. Uma pequena regressão, que permaneceu por 12 semanas, foi constatada no paciente com adenocarcinoma medular de tireóide. Problemas de formulação tornaram-se um fator limitante para a continuação do estudo no nível 5 de escalonamento de dose (96 µg/Kg). O estudo foi, então, suspenso até que haja a solução do problema mencionado.

INTRODUÇÃO

Apesar da ocorrência de importantes evoluções na cura de vários tipos de neoplasias malignas através da terapia citotóxica, especialmente em crianças e adultos jovens, não têm sido observados resultados semelhantes na maior parte dos tumores incidentes em adultos. Infelizmente, a sobrevida total dos pacientes com essas doenças não foi significativamente alterada pelo tratamento nas últimas décadas (1). Assim, é de grande importância que novos agentes e abordagens, agindo por intermédio de novos mecanismos de ação, especialmente aqueles que ajam através de vias de ação antitumorais mais específicas (2). Por possuírem uma baixa seletividade em relação à célula tumoral, os agentes citotóxicos clássicos possuem uma estreita margem terapêutica, ocasionando efeitos colaterais importantes em doses terapêuticas, em adição à ocorrência de mutações que conferem resistência em relação a esses agentes (3).

Ao longo dos últimos anos, o papel dos fatores de estimulação de crescimento autócrinos e parácrinos tem sido claramente demonstrado em tumores experimentais e humanos (4). Utilizando linhagens de carcinoma pulmonar de pequenas células, Moody e colaboradores demonstraram a expressão de alta afinidade de receptores de superfície à bombesina (5, 6). Posteriormente, Cuttitta e colaboradores confirmaram o papel dos fatores de crescimento tumoral tipo bombesina-similares, sugerindo que esse mecanismo autócrino possa ser crítico para a persistência do crescimento tumoral naquele modelo (7).

Os antagonistas da bombesina representam uma nova abordagem ao tratamento do câncer e merece uma avaliação clínica apropriada. Neste protocolo, propomos um estudo de Fase I e de farmacocinética clínica do RC-3095, um composto que tem revelado uma atividade antitumoral promissora em modelos preclínicos, bem como um padrão de toxicidade favorável em animais.

A bombesina é um peptídeo 14-aminoácido que foi primeiramente isolado por Anastasi e colaboradores (8) a partir da pele do sapo *Bombina bombina* em 1971. A bombesina tem muitas atividades biológicas, especialmente no trato gastrointestinal e

no sistema nervoso central. Um análogo mamífero da bombesina, que possui uma potente atividade liberadora de gastrina (Peptídeo Liberador de Gastrina, GRP em Inglês) foi caracterizado quimicamente inicialmente a partir do tecido gástrico de suínos (9). Demonstrou-se que os peptídeos semelhantes à bombesina têm um efeito de estímulo para a liberação do hormônio de crescimento e do hormônio luteinizante por intermédio de receptores específicos existentes no sistema nervoso central (10, 11).

A estrutura da bombesina e do GRP é mostrada na Figura 1.

Ao longo da última década, vários estudos têm registrado a ocorrência de efeitos estimulatórios ao crescimento de tumores experimentais por parte dos peptídeos semelhantes à bombesina (12, 13, 14, 15, 16). Recentemente, foram publicados outros estudos sobre o assunto (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Tais achados demonstram claramente as propriedades autócrinas e/ou parácrinas desses peptídeos tanto nos tumores experimentais quanto nos tumores humanos, sugeridas por Cuttitta e colaboradores em 1985 (7). Além disso, a administração de antagonistas da bombesina evidenciou a regressão objetiva de tumores e até mesmo cura em alguns tumores humanos, como carcinoma pulmonar de pequenas células (25, 26, 27, 28), pancreático (29, 30, 31), gastrointestinais (32, 33, 34), mamários (35, 36, 37), prostáticos (38, 39) e outros tumores xenotransplantados em roedores (40, 41).

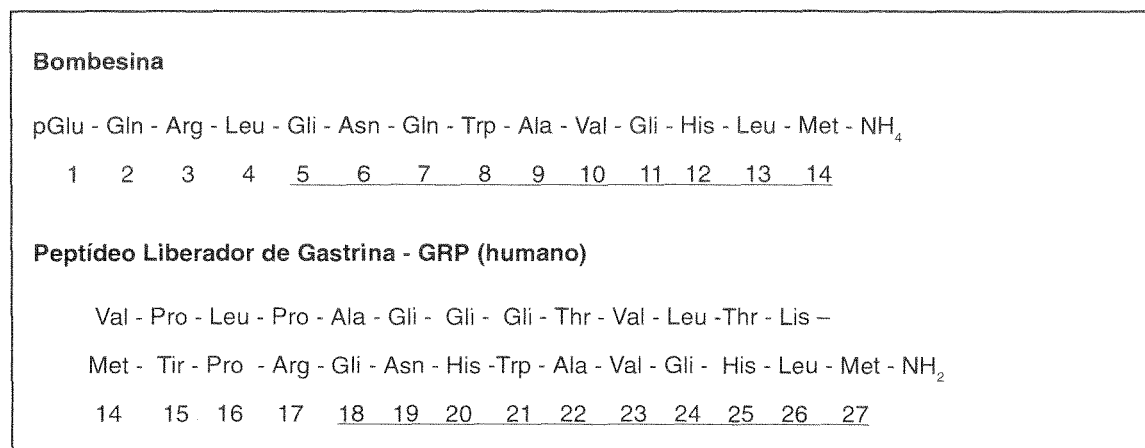


Figura 1 Estrutura da bombesina e do GRP.

As observações acima mencionadas levaram alguns pesquisadores a considerar a avaliação do potencial terapêutico do uso clínico de antagonistas da bombesina (42). Com esse objetivo, Schally e colaboradores sintetizaram uma série de análogos da bombesina, dos quais o RC-3095 tem mostrado um perfil pré-clínico favorável. Foi registrada a capacidade do RC-3095 inibir de forma significativa o crescimento de vários modelos experimentais de tumor e a sua atividade antitumoral *in vitro*, bem como em experimentação animal. Adicionalmente, os estudos toxicológicos com o RC-3095, administrado em uma dose subcutânea diária, não demonstraram qualquer efeito tóxico importante, ocorrendo apenas alguma irritação no local da injeção da substância. Considerando-se que não foi constatada uma dose de tolerância máxima (DTM) em estudos com animais (o RC-3095 foi administrado em ratos e cães em doses de até 1,0 e 2,5 mg/Kg, respectivamente), a dose inicial em humanos foi estimada a partir do nível de dose que produziu respostas em estudos com camundongos portadores de tumores humanos (32), a saber 8 µg/Kg de peso diários por 21 dias consecutivos.

Neste estudo, os autores apresentam dados confirmatórios da inexistência de toxicidade significativa do RC-3095 em camundongos e ratos que receberam a dose e o escalonamento do agente que foi escolhido para iniciar o primeiro o primeiro estudo de Fase I do RC-3095 realizado em pacientes com tumores sólidos avançados. A seguir, são apresentados os dados obtidos a partir das primeiras séries de pacientes incluídos no estudo. Infelizmente, o estudo foi temporariamente suspenso devido à precipitação da solução de RC-3095 nos níveis mais altos de dose. Esse problema está sendo contornado através da modificação na formulação para uso clínico.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Desenho do estudo em animais

Foram obtidos ratos Balb-C (machos) com idade de 6 a 8 semanas do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Os animais foram utiliza-

dos com idade entre 3 a 6 meses de idade e mantidos em ambiente com luminosidade controlada. Os ratos foram randomizados em 2 grupos, um braço controlado com 10 ratos recebendo solução salina a 0,9% e um braço de tratamento dividido em 4 subgrupos A, B, C e D de 10 ratos cada um, recebendo o RC-3095 em diferentes doses. A solução salina ou o RC-3095 foram administrados através de injeções subcutâneas diárias por 21 dias em condições e volume semelhantes. Os subgrupos de tratamento A, B, C e D receberam doses diárias de RC-3095 correspondentes a 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Todos os animais foram alimentados de acordo com a rotina padronizada e mantidos em gaiolas separadas com 10 animais cada. Os animais eram inspecionados diariamente para detecção de sinais ou de qualquer comportamento anormal na gaiola e/ou sinais de toxicidade clínica. Em caso de mortalidade, o investigador foi instruído para separar os órgãos (fígado, intestino, coração, cérebro, pulmão e baço) e prepará-los para exame patológico.

Visando a experimentos adicionais, foram obtidos ratos Wistar (adultos) do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e transportados para o mesmo ambiente e condições descritas acima. Os controles (10 ratos) receberam solução salina a 0,9%, ao passo que os animais tratados (subgrupos A e B com 10 ratos cada) receberam RC-3095 nas doses mais baixas e mais elevadas aplicadas nos ratos do experimento anterior (8 e 64 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ diários por 21 dias consecutivos, respectivamente).

b) Desenho do estudo clínico de Fase I

Uma vez confirmada a segurança da dose inicial do RC-3095 em animais, iniciou-se o estudo de Fase I em pacientes com tumores sólidos refratários. Este foi um estudo de Fase I não-randomizado, em que pacientes consecutivos receberam o RC-3095 em um intervalo de pelo menos uma semana até a inclusão de outros pacientes. Grupos de 3 a 5 pacientes foram testados em cada nível de dose, sem escalonamento intrapaciente.

As doses foram escalonadas inicialmente em 100%, já que não foram observados efeitos tóxicos em estudos toxicológicos pré-clínicos. Se fosse detectada toxicidade clínica,

o escalonamento da dose seguiria uma escala modificada de Fibonacci. Em níveis tóxicos, um número maior de pacientes seriam admitidos com o objetivo de ser estabelecida a Dose Tolerada Máxima (DTM). Posteriormente, uma dose de 15 a 20% abaixo da DTM seria avaliada em um grupo adicional de pacientes para determinar a dose recomendada para estudos de Fase II.

Paralelamente, foram dosados níveis de gastrina em cada paciente, visando à sua utilização como marcador do efeito antibombesina do RC-3095. Como a gastrina e a bombesina têm uma alta semelhança de seqüências, a liberação de gastrina pode ser potencialmente inibida pelo RC-3095, indicando uma dose biologicamente aplicável dessa substância em seres humanos.

c) Critérios de inclusão para o estudo de Fase I

Os pacientes preencheram todos os seguintes critérios: diagnóstico comprovado histológica ou citologicamente de tumor sólido, preferencialmente câncer pulmonar de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de cólon, câncer de mama ou câncer de próstata; progressão clínica da doença; expectativa de vida maior que três meses; estado de desempenho de 0 a 3 (OMS – Anexo IV); testes de função hepática e bilirrubinas até duas vezes o limite superior da normalidade; contagem de células sanguíneas dentro dos limites da normalidade: leucócitos $> 4,0 \times 10^9 / l$, Plaquetas $> 100 \times 10^9 / l$, hemoglobina $> 8 \text{ g/d l}$; creatinina sérica igual ou inferior a 2 mg/dl; ausência de infecção ativa e/ ou descontrolada; doença crônica estável; ausência de doença mental; câncer sem tratamento convencional possível ou para o qual o tratamento convencional tenha falhado; consentimento informado do paciente.

d) Critérios de exclusão para o estudo de Fase I

Foram aplicados os seguintes critérios de exclusão: pacientes com doença prévia no sistema nervoso central; gravidez ou lactação; enfermidade grave, física ou psiquiátri-

ca concomitante que pudesse interferir no estudo ou na tolerância do paciente ao tratamento; tratamento com drogas que afetem a medula óssea e que não possa ser interrompido.

e) Avaliação pré-tratamento e avaliação de seguimento

Previamente ao início de cada ciclo (não mais que 7 dias), os pacientes foram submetidos a exame físico, contagem completa de células sangüíneas e análise da urina. Os exames bioquímicos incluíram eletrólitos, proteína total, albumina, glicose, bilirrubinas, fosfatase alcalina, Gama GT, aminotransferases, desidrogenase láctica, creatinina e ácido úrico. Foram realizados também eletrocardiograma e RX de tórax. A contagem de células sangüíneas foi executada pelo menos duas vezes por semana, os exames bioquímicos semanalmente e o ECG e o RX a cada três semanas. O estado de desempenho e a toxicidade foram avaliados em intervalos semanais.

f) Procedimento de dosagem e avaliação de toxicidade

O RC- 3095 foi obtido da Asta Farmacêutica, Alemanha, em frascos padronizados para administração subcutânea em preparações liofilizadas. O agente era reconstituído em água esterilizada para injeção em um volume de 2 ml. Os frascos reconstituídos eram mantidos a 4°C e administrados nos pacientes por via subcutânea, diariamente, por 21 dias consecutivos. A dose inicial foi de 8 µg/Kg de peso administrados através de uma injeção subcutânea diária por 3 semanas. O tratamento prosseguia na ausência de evidência de progressão da doença.

A cada nível de dose foram incluídos pelo menos 3 pacientes. O escalonamento da dose em um mesmo paciente não foi permitido. A dose foi administrada uma vez ao dia e escalonada em 100% em cada grupo de pacientes nos níveis de dose I, II e III. Os níveis de dose IV e V incluíram um escalonamento de 50% da dose e a administração era realizada 2 vezes ao dia. Esse procedimento de escalonamento de doses foi planejado com base em uma escala modificada de Fibonacci (escalonamento de doses em 50%,

33% e 25%, respectivamente) até que a Dose Máxima Tolerada (DMT) ou a Dose Modulatória Ótima (DMO) fossem atingidas.

A DMT foi definida como a dose na qual uma toxicidade limitante fosse observada em um determinado nível de dose em 3 ou mais pacientes. A DMO significava a dose do RC-3095 que provocasse a queda da gastrina plasmática do nível basal superior a 50%. Para os pacientes que receberam RC-3095 em níveis de doses toleráveis (toxicidade inferior ao grau 4), os ciclos foram repetidos no mesmo nível de dose até que o intervalo de 3 semanas fosse completado.

Os objetivos do estudo eram definir o perfil de toxicidade, a Toxicidade Dose-Limitante (TDL), a Dose Máxima Tolerada (DMT) e/ou a Dose Modulatória Ótima (DMO) e as doses recomendadas para estudos de Fase II do RC-3095. As toxicidades foram quantificadas de acordo com o Critério Comum de Toxicidade do Instituto Nacional do Câncer (NCI-CTC). A TDL foi definida como pelo menos um dos seguintes eventos: contagem absoluta de neutrófilos (CAN) não inferior a 500/UL por mais de 7 dias ou associada a febre superior a 38°C; contagem de plaquetas inferior a 25.000/UL ou mucosite grau 3-4; náusea e vômitos e/ou diarreia.

Uma vez atingida a DMT, outros grupos de pacientes seriam tratados em um nível reduzido de dose (cerca de 20% de redução) para determinar a dose recomendada para o estudo de Fase II. A dose sugerida para estudos de Fase II foi definida como a dose abaixo da DMT que ocasionasse toxicidade reversível e pudesse ser considerada tolerável para os pacientes, de acordo com os investigadores, em repetidos ciclos.

g) Medidas dos níveis de gastrina no plasma

Cinco ml de sangue heparinizado foram obtidos imediatamente antes da administração da droga para preparação de plasma 1, 2, 8 e 24 horas após a administração, bem como semanalmente. As amostras eram imediatamente cetrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O plasma separado era transferido para tubos plásticos identificados

com o nome do paciente, a data e a hora de coleta do sangue. O plasma era então armazenado a -20°C até a análise. Os níveis de gastrina eram medidos por radioimunoensaio (RIE) no Setor de Bioquímica do Laboratório Faillace, Porto Alegre, Brasil. Para este estudo de Fase I, a dose do RC-3095 suficiente para reduzir em pelo menos 50% dos níveis de gastrina plasmática, em relação ao padrão em um mesmo paciente, seria considerada como uma evidência de efeito biológico.

h) Considerações éticas

O protocolo deste estudo foi submetido ao Comitê Ético e Científico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Ministério da Saúde. Todos os procedimentos e decisões estavam de acordo com a legislação brasileira e com as recomendações éticas internacionais.

O médico responsável deveria informar o paciente sobre o conhecimento passado e presente da droga estudada com especial referência ao que se sabe sobre a atividade e a toxicidade da mesma. Enfatizou-se que o paciente poderia desistir do tratamento em qualquer momento do estudo. Antes da inclusão no estudo, o paciente assinava um termo de consentimento informado, de acordo com as recomendações da Boa Prática Clínica. O principal investigador tinha de assegurar que o estudo estava sendo conduzido em consonância com a Declaração de Helsinki e que havia sido aprovado pelo Comitê de Ética local e pelas autoridades governamentais responsáveis.

i) Considerações estatísticas

Neste estudo de Fase I, os aspectos metodológicos foram baseados em padrões internacionalmente estabelecidos publicados pelo INC, OERTC e CPC para a pesquisa de novos agentes anticâncer em seres humanos. Foram aplicados somente procedimentos considerados aceitáveis por instituições internacionais com base em condutas éticas e padrões científicos apropriados.

RESULTADOS

a) Estudo com animais

Os resultados dos estudos toxicológicos nos grupos-controle e de tratamento estão resumidos na Tabela 1. Não houve alterações detectáveis de comportamento, de atividade ou de peso entre os grupos. Um animal morreu no grupo-controle no dia 18. Nenhuma mortalidade foi observada nos subgrupos de tratamento. Dois animais foram retirados do subgrupo B devido a problemas técnicos durante a administração da droga nos dias 8 e 13.

Considerando-se que nenhuma mortalidade ou efeito tóxico significativo foram observados em nossos estudos com ratos, fato que confirma o relatório toxicológico animal prévio (descrito em detalhes na revisão da literatura), o exame patológico dos animais não foi realizado. Com a finalidade de confirmar o perfil de segurança do RC-3095, estudos similares foram realizados em ratos, utilizando-se a dose inicial planejada para estudos humanos de 8 µg/Kg/dia, bem como o nível máximo administrados aos ratos, ou seja, de 64 µg/Kg/dia.

Os resultados dos estudos em ratos são apresentados na Tabela 2. Novamente, nenhum caso de mortalidade ocorreu nos grupos estudados. A única anormalidade ob-

Tabela 1 Resultados resumidos dos estudos toxicológicos confirmatórios do RC-3095 em ratos.*

Tipo de efeito	Comportamento	Local	Queda-pêlo	Piloereção	Perda peso	Mortalidade
Controle (n=10) (0,9% sol. salina)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
<i>RC-3095**</i> (n=10 por subgrupo)						
A (8 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
B (16 µg/Kg)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
C (32 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
D (64 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

* Sem significância estatística entre controles e animais tratados.

** Tratamento diário por 21 dias consecutivos.

Tabela 2 Resultados resumidos dos estudos toxicológicos confirmatórios do RC-3095 em ratos. Níveis mínimos e máximos.*

Tipo de efeito	Comportamento	Local	Queda-pêlo	Piloereção	Perda peso	Mortalidade
Controle (n=10) (0,9% sol. salina)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
<i>RC-3095**</i> (n=10 por subgrupo)						
A (8 µg/Kg)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
B (64 g/Kg)	0/10	1/10#	0/10	0/10	0/10	0/10

* Sem significância estatística entre controles e animais tratados.

** Tratamento diário por 21 dias consecutivos.

Irritação leve e edema no local de injeção que desapareceu posteriormente sem cicatriz ou lesão residual.

servada foi uma leve irritação e edema no local da injeção em um animal tratado no subgrupo B em torno dos dias 6-7, com recuperação espontânea posterior. O animal foi mantido em tratamento pelo período de 21 dias sem efeitos tóxicos detectáveis.

b) O estudo clínico de Fase I

Uma vez reconfirmada a segurança da dose inicial do RC-3095 em camundongos e ratos, iniciamos um estudo de Fase I em pacientes com tumores sólidos avançados no qual se procurou definir o perfil de toxicidade, a TDL, a DMT e a DMO (se possível) e as doses recomendadas para estudos do RC-3095. As características dos pacientes avaliados no estudo encontram-se na Tabela 3. Foram incluídos 15 pacientes, representando um espectro de tumores sólidos refratários usualmente observados nas instituições participantes. Destes, 6 eram do sexo masculino e 9 do sexo feminino, com mediana de idade de 60 anos (variação de 32-80 anos). A mediana do estado de desempenho da OMS foi 1 (variação de 0-3). Os tipos de tumor foram 7 adenocarcinomas (cólon 2, rim 2, pâncreas 2 e próstata 1), 2 carcinomas ductais invasivos (mama), 1 carcinoma pulmonar de pequenas células, 1 carcinoma epidermóide (esôfago), 1 adenocarcinoma medular (tireóide), 1 melanoma maligno (coróide), 1 fibroistiocitoma e 1 schwannoma maligno (partes

Tabela 3 Características dos pacientes incluídos no estudo de Fase I.

Características	Número de pacientes
Masculino/feminino	6/9
Mediana de Idade	60 (32-80)
Mediana do estado de desempenho (OMS)	1 (0-3)
Tipo de tumor	
Mama	2
Cólon	2
Rim	2
Pâncreas	2
Esôfago	1
Pulmão	1
Tireóide	1
Próstata	1
Melanoma maligno	1
SPM*	2
Terapias prévias	
Cirurgia	11
Quimioterapia	11
Radioterapia	6
Imunoterapia	1
Hormonioterapia	4

* SPM: Sarcoma de Partes Moles.

moles). Onze pacientes tinham radioterapia prévia, 11 cirurgia, 6 radioterapia, 4 hormonioterapia e 1 imunoterapia.

Foi realizado um total de 40 ciclos, com uma mediana de 2 ciclos por paciente (variação de 1-5). O RC-3095 foi administrado em grupos consecutivos de pacientes em um bolo único através de injeções subcutâneas em 3 diferentes níveis de dose (8 µg/Kg de peso, 16 µg/Kg de peso, 32 µg/Kg de peso). Uma emenda ao protocolo foi introduzida a partir desse nível de dose devido à total ausência de toxicidade nos níveis I, II e III. A partir desse ponto, o RC-3095 foi escalonado através da administração do agente 2 vezes ao dia nos níveis de dose IV e V devido à observação em laboratório de que a interação deste com receptores bombesina-similares é mais favorável com tal sistemática, em vários modelos de tumores, em termos de inibição do efeito estimulatório de crescimento autócrino, quando administrado mais frequentemente em camundongos com tumores transplantados (Schally AV, comunicação pessoal). Assim, os níveis de dose IV

e V foram de 64 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso e 96 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso (dose total) administrados em 2 doses diárias, respectivamente. Cada ciclo do RC-3095 foi administrado diariamente por 21 dias consecutivos. O escalonamento de doses administradas neste estudo está demonstrado na Tabela 4.

Até o nível de dose V, a única toxicidade hematológica observada foi anemia, era provavelmente relacionada à doença (Tabela 5). Anorexia moderada, fadiga e dor no local da injeção também foram observados em alguns casos (Tabela 6). Nenhum caso de TDL foi documentado, e a TDM não foi alcançada nos níveis de dose estudados.

Uma regressão menor foi documentada em uma paciente com carcinoma medular de tireóide que foi tratada no nível de dose III. Essa paciente, uma mulher de 72 anos de idade, desenvolveu metástases pulmonares e hepáticas múltiplas e não respondeu ao tratamento com Interferon-alfa e análogos da Somatostatina. Apresentou ainda uma redução de cerca de 30% no produto do diâmetro das lesões mensuráveis em ambos os pulmões e no fígado. Concomitantemente, houve uma marcada melhora da dispnéia

Tabela 4 Escalonamento dos níveis de dose no estudo de Fase I.

Nível de dose	RC-3095 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso)
I	8
II	16
III	32
IV	64 (32 duas vezes ao dia)
V	96 (48 duas vezes ao dia)

Tabela 5 Graus de toxicidade máximo para todos os ciclos (NCI-CTC).

Nível de dose	I	II	III	IV	V
Número de Pacientes	3	3	3	3	3
Número de Ciclos	12	7	7	5	9
Anemia (%)					
Grau 3	0	0	0	1	1
Grau 4	8	0	0	1	1

NCI-CTC = Instituto Nacional do Câncer – Critérios Comuns de Toxicidade.

Tabela 6 Grau de toxicidade (NCI-CTC) em todos os ciclos no estudo de Fase I.

(N = 15; 40 ciclos)

	Nº	%
Anemia (%)		
Total	6	15,0
Grau 1-2	3	7,5
Grau 3	1	2,5
Grau 4	2	5,0
Dor (%)		
Total	9	22,5
Grau 1-2	9	22,5
Grau 3	0	0
Grau 4	0	0
Anorexia (%)		
Total	7	17,5
Grau 1-2	7	17,5
Grau 3	0	0
Grau 4	0	0
Fadiga (%)		
Total	5	12,5
Grau 1-2	5	12,5
Grau 3	0	0
Grau 4	0	0
Dor local injeção (%)		
Total	4	10
Grau 1-2	4	10
Grau 3	0	0
Grau 4	0	0

NCI-CTC = Instituto Nacional do Câncer – Critérios Comuns de Toxicidade.

N = Número de pacientes.

cerca de 4 semanas após o início do tratamento. A duração da resposta foi de 12 semanas. Infelizmente, houve evolução posterior da doença no fígado e o tratamento foi interrompido. Os demais pacientes evoluíram com progressão clínica progressiva da doença após 1-2 ciclos de tratamento.

Os níveis plasmáticos de gastrina foram medidos em 11 dos 15 pacientes incluídos no estudo, os quais concordaram em participar dessa fase do mesmo. A análise dos níveis de gastrina plasmática não demonstrou qualquer alteração significativa dos níveis basais após a administração do RC-3095. Infelizmente, nenhum plasma foi coletado da paciente com carcinoma de tireóide. A razão disso foi o fato de ela apresentar-se muito

sintomática e presa ao leite e de a família ter solicitado a não-realização de coletas repetidas de sangue.

O nível de dose VI planejado representava novamente um escalonamento de 50% da dose, ou seja, o RC-3095 seria administrado na dose de 144 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ divididos em 72 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ duas vezes ao dia. Entretanto, problemas de formulação da droga foram observados durante a preparação no nosso setor de farmácia. A solução precipitava facilmente após a diluição padrão em água. O uso de um volume maior também foi considerado inadequado, uma vez que poderia causar dor e irritação locais. Em consequência disso, o estudo de Fase I do RC-3095 foi temporariamente suspenso e o composto mandado de volta ao laboratório para novos testes de formulação.

DISCUSSÃO

O RC-3095 é o primeiro antagonista da bombesina-similar a fazer parte de estudos clínicos. A decisão de trazer esse agente para o emprego clínico foi baseado em seu inovador mecanismo de ação, em sua impressionante atividade antitumoral em modelos pré-clínicos – incluindo carcinoma pulmonar de pequenas células, mama, próstata e tumores gastrointestinais de origem humana xenotransplantados em camundongos – bem como na falta de toxicidade desse composto em estudos toxicológicos com animais (4, 7). Da mesma forma, a escolha da via, do esquema de administração e da dose inicial do RC-3095 para estudo em humanos baseou-se em diversos estudos realizados previamente em animais (36, 37, 38).

Considerando o fato de que esse agente seria testado pela primeira vez em humanos, decidimos confirmar previamente os dados de toxicidade animal, os quais sugeriam um perfil totalmente atóxico. Assim, realizamos uma série de experimentos em camundongos e ratos no espectro de dose recomendado para início de estudos de Fase I. Os resultados dos nossos estudos toxicológicos confirmatórios em camundongos Balb-C e ratos Wistar corroboraram as observações prévias de que o RC-3095 é realmente isen-

to de qualquer efeito tóxico detectável quando administrado em camundongos e ratos pela via subcutânea, em nosso caso, por 21 dias consecutivos.

Quando iniciamos o planejamento do nosso estudo de Fase I, tornou-se claro para nós que a metodologia clássica dos estudos de Fase I, na qual a toxicidade é utilizada para balizar a identificação da TDL, da DMT e da dose recomendada para estudos adicionais, poderia não ser apropriada para o estudo de um composto como o RC-3095. De fato, este difere de modo significativo dos agentes quimioterápicos clássicos rotineiramente utilizados no tratamento do câncer, uma vez que não é citotóxico para os tecidos normais e exerce seu efeito antitumoral por meio da inibição de um mecanismo estimulatório de crescimento tumor-dependente (25).

Dessa forma, decidimos acrescentar à metodologia do estudo de Fase I padrão a dosagem dos níveis de gastrina dos pacientes. A argumentação para tal procedimento foi de que o RC-3095 inibe os receptores nas células tumorais, o que também poderia interferir potencialmente em receptores GRP de vários tecidos. Como a liberação de gastrina é dependente da estimulação do GRP, a dosagem dos níveis de gastrina sérica em pacientes recebendo RC-3095 no estudo de Fase I poderia ser potencialmente empregado como uma opção de marcador do efeito biológico da mesma (43).

Essa mensuração também poderia nos oferecer a oportunidade de talvez interromper o estudo de Fase I quando a DMO, representando a dose que produzisse uma inibição significativa dos níveis plasmáticos de gastrina, fosse identificada. Tal estratégia foi considerada de extrema importância em nosso estudo devido à possibilidade do risco de que o escalonamento de dose de um composto atóxico como o RC-3095 pudesse ocasionar um alto número de etapas de escalonamento sem a constatação da DMT. A variabilidade dos níveis séricos de gastrina talvez justifiquem o fato de não ter sido encontrada inibição com o uso do RC-3095. Planejamos realizar, no seguimento desse estudo, a dosagem após estímulo com GRP, o que tornará os resultados mais fidedignos.

Até o momento, nossos resultados confirmaram que o RC-3095 é realmente um composto atóxico também em humanos. O seguimento da avaliação detalhada de seus

potenciais efeitos tóxicos nas primeiras séries de 15 pacientes, distribuídos em 5 diferentes níveis de dose, não evidenciou qualquer toxicidade relevante. No entanto, o fator limitante para a continuação do estudo constituiu-se na sua formulação para uso em humanos. Como o composto estava sendo injetado 2 vezes por dia pela via subcutânea, em um volume máximo de água estéril de 2-3 ml por 21 dias consecutivos em cada ciclo de tratamento, doses mais elevadas demandariam um volume maior do diluente. Isto foi considerado impraticável em termos da logística do estudo. Em acréscimo, causou a precipitação do composto imediatamente após a diluição em volume superiores a 3 ml de água estéril. Esses fatos causariam, muito provavelmente, desconforto, dor ou irritação no local da injeção. Por isso, decidiu-se suspender temporariamente o estudo e retornar ao laboratório para desenvolver uma nova formulação.

A constatação da ocorrência de regressão tumoral em uma paciente com carcinoma medular de tiróide avançado e refratário, que também foi acompanhado de melhora dos sintomas, reveste-se de igual importância. Embora esse tipo de tumor não esteja claramente associado à expressão de receptores bombesina-similares nas membranas celulares, tal fato certamente nos estimula a continuar o estudo e a analisar com mais profundidade as circunstâncias. Sabe-se que não existe um esquema de tratamento sistêmico para essa enfermidade que seja claramente efetivo e que seja capaz de garantir um ganho significativo de sobrevida para os pacientes. Assim, encaramos com grande expectativa a inclusão de pacientes adicionais com esse diagnóstico no estudo.

Ficamos muito entusiasmados por termos documentado sinais de atividade biológica do RC-3095 na paciente acima mencionada, pois isso sugere que podemos estar atingindo doses satisfatórias para o desencadeamento de efeitos antitumorais. Esperamos que, no futuro, efeitos positivos semelhantes possam ser observados dentro desse espectro de doses, especialmente em pacientes com tumores, como o carcinoma pulmonar de pequenas células, já que existe um claro embasamento para o emprego do RC-3095 em pacientes cujos tumores demonstram expressar receptores bombesina-similares (5).

As perspectivas para os antagonistas dos receptores de fatores de crescimento como potenciais tratamentos anticâncer ainda são incipientes. Apesar disso, existe um grande número de publicações que ilustram o forte interesse da comunidade científica na fisiologia dos receptores bombesina-similares e no uso terapêutico dos seus antagonistas.

Siegfried e colaboradores (44), por exemplo, baseando-se no fato de que o Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP) tem atividade mitogênica no carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e de que é produzido por essas células tumorais, demonstraram que o GRP também é um fator de crescimento autócrino para carcinomas de não pequenas células (CPNPC). Utilizando-se da reação em cadeia de transcrição da polimerase reversa (RT-PCR), detectaram receptores GRP expressos em várias linhagens de células de CPNPC, sugerindo que o GRP seja fator de crescimento autócrino para CPNPC.

Em outro estudo, Sun e colaboradores (45) investigaram a presença e as características dos receptores funcionais para bombesina/GRP em espécimes de adenocarcinoma prostático humano, através de ensaio radiorreceptor e da expressão do mRNA dos três subtipos de receptor por RT-PCR. Os autores observaram que aproximadamente 63% mostraram alta afinidade, locais de ligação de baixa capacidade para bombesina/GRP e alguns dos espécimes receptor-positivo também evidenciaram um segundo local de ligação. Assim, concluíram que a detecção de uma ampla distribuição de receptores de bombesina/GRP em carcinomas prostáticos humanos favorece a impressão de que estes possam estar envolvidos na modulação da proliferação tumoral e sugere que abordagens baseadas na ligação dos receptores por antagonistas da bombesina ou de novos análogos-alvo citotóxicos da bombesina para o câncer de próstata devem ser considerados para o tratamento dessa enfermidade.

Chatzistamou e colaboradores (46) estudaram os efeitos do RC-3095 no crescimento de linhagens de células OV-1063 de carcinoma de ovário humano xenotransplantados em camundongos. O RC-3095, administrado em uma dose de 20 µg/Kg/dia, reduziu o volume dos tumores OV-1063 em 47,7%. Concluíram que tais resultados indicam que os

antagonistas da bombesina/GRP inibem o crescimento de tumores ovarianos humanos OV-1063 por mecanismos que provavelmente envolvem a regulação dos c-jun e c-fos proto-oncogenes.

Finalmente, Kiaris e colaboradores (47) avaliaram os efeitos do RC-3095 no crescimento de linha celulares U-87MG de glioblastoma humano xenotransplantado em camundongos. A análise por RT-PCR mostrou que os implantes de U-87MG expressaram mRNA para os subtipos de receptores de bombesina BRS-1 (receptor GRP) e BRS-2 (receptor para neuromedina-B), mas o mRNA para GRP ligante não foi encontrado em células U-87MG, sugerindo que o GRP pode estimular a proliferação de glioblastomas U-87MG através de um mecanismo parácrino. Os níveis de mRNA para c-fos oncogene foram reduzidos em 30 a 40% em tumores U-87MG tratados com o RC-3095. Em células de glioblastoma U-373MG, que também expressam BRS-1, e células U-87MG, cultivadas *in vitro*, o GRP induziu a expressão de c-fos mRNA e algum c-jun mRNA de uma forma tempo-dependente, com o efeito máximo ocorrendo 2 horas após a estimulação e o retorno para níveis basais 8 horas após. Os autores concluíram que esses resultados indicam que os antagonistas da bombesina/GRP inibem o crescimento de glioblastomas U-87MG através de um mecanismo que pode envolver a regulação do c-fos oncogene.

Como observado nos estudos acima mencionados, o número de tipos de tumor para os quais um fundamento científico para o uso do RC-3095 foi estabelecido está expandindo-se extraordinariamente. Assim, aguardamos com grande expectativa a retomada do nosso estudo de Fase I em pacientes com tumores sólidos e a identificação de uma dose adequada do RC-3095 a ser recomendada para estudos de Fase II em pacientes com diversos tipos de câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WORKMAN, P. D'INCALCI, Berdel, W.E., *et al.* New approaches in cancer pharmacology; drug design and development. *Eur J Cancer*, 28:1190-1200, 1992.
2. SIKORA, S., ADVANI, V., KOROLTCHOUK, I., *et al.* Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Annals of Oncology*, 10:185-190, 1999.
3. SCHWARTSMANN, G., WORKMAN, P. Anticancer Drug Screening and Discovery in the 1990s: A European Perspective. *Eur. J. Cancer*, 29: 3-14, 1993.
4. SCHWARTSMANN, G., WINOGRAD, B., PINEDO, H.M. The main steps in the development of new anticancer agents. *Radiotherapy and Oncology*, 12:301-313, 1988.
5. MOODY, T.W., PERT, C.B., GAZDAR, A.F, CARNEY, D. MINNA, J.D. High levels of bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science*, 214: 1246-1248, 1981.
6. MOODY, T.W., BEERTNESS, V., CARNEY, D.N. Bombesin – like peptides and receptors in human tumor cell lines. *Peptides*, 4:683-686, 1983.
7. CUTTITTA, F., CARNEY, D.N., MULSHINE, J., *et al.* Bombesin – like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature*, 316:823-836, 1985.
8. ANASTASI, A., ESPARMER, V., BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia (Basel)*, 27:166-167, 1971.
9. MCDONALD, T.J., NILSON, G., VAGNE, M., BLOOM, S.R., MUTT, V.A. Gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut*, 19:767-774, 1978.
10. PINSKI, J., YANO, T., GROOT, K., *et al.* Endocrine effects of new bombesin / gastrin-releasing peptide antagonists in rats. *Am J Physiol*, 263 (4Pt 1): E712-717, 1992.
11. PINSKI, J., YANO, T., SCHALLY, A.V. Inhibitory effects of new bombesin receptor antagonist RC-3095 on the luteinizing hormone release in rats. *Neuroendocrinology*, 56: 831-837, 1992.
12. AVIS, F.P., MANECKJEE, R., CUTTITTA, F., *et al.* The role of gastrin releasing peptide in a pancreatic tumor cell line (CAPAN). *Proc. AACR*, 29:54, 1988.
13. DAMGE, C., HAJRI, A., LHOSTE, E., Aprahamian, M. Comparative effect of chronic bombesin, gastrin-releasing peptide and caerulein on the rat pancreas. *Regul Pept*, 20:141-150, 1988.
14. KUSYK, C.J., MCNIE, N.O., JOHNSON, L.R. Stimulation of growth of a cancer cell line by gastrin. *Am J Physiol*, 251:G597-601, 1986.
15. NARAYAN, S., GUO, Y.S., TOWNSEND, C.M., SINGH, P. Specific binding and growth effects of bombesin – related peptides on mouse colon cancer cell vitro. *Cancer Res*, 50:6772-6778, 1990.

16. SAINSBURY, J.R.C., FARNDON, J.R., SHERBET, G.V., HARRIS, A.L. Epidermal factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. *Lancet I*: 363-366, 1985.
17. GUGGER, M., REUBI, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol*, 155:2067-2076, 1999.
18. WANG, Q.J., KNEZETIC, J.A., SCHALLY, A.V., POUR, P.M., ADRIAN, T.E. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int J Cancer*, 68:528-534, 1996.
19. HAN, K., CHEVALIER, S., VIALLET, J., BAZINET, M., APRIKIAN, A.G. Bombesin induced signal transduction in androgen-insensitive human prostate cancer cells (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc. Cancer Res*, 36:A247, 1995.
20. YOSHIDA, T., KUNITO, H., SAIJO, N. Growth factor and signal transduction in lung cancer cell Nippon Rinsho, 58: 1023-1030, 2000.
21. SAURIN, J.C., NÉMOZ Gaillard, E., SORDAT, B. Bombesin stimulates adhesion, spreading, lamellipodia formation, and proliferation in the human colon carcinoma Isreco1 cell line. *Cancer Res*, 59: 962-967, 1999.
22. CHAVE, H.S., GOUGH, A.C., PALMER, K., PRESTON, S.R., PRIMROSE, J.N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa *Br J Cancer*, 82:124-130, 2000.
23. BOLD, R.J., ISHIZUKA, J., YAO, C.Z., TOWNSEND, C.M. Jr, THOMPSON, J.C. Bombesin stimulates in vitro growth of human breast cancer independent of estrogen receptors status. *Anticancer Res*, 18: 4051-4056, 1998.
24. MARKWALDER, R., REUBI, J.C. Gastrin – releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res*, 59:5, 1152-1159, 1999.
25. MAHMOUD, S., STALEY, J., TAYLOR, J., BOGDEN, A., MOREAU, J.P., COY, D., AVIS, I., CUTTITTA, F., MULSHINE, J.L., MOODY, T.W. (Psi^{13,14}) bombesin analogues inhibit growth of small cell , lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 51:1798-1802, 1991.
26. LAYTON, J.E., SCANLON, D.B., SOVENY, C., and MORSTYN, G. Effects of bombesin antagonists on the growth of small cell lung cancer cells in vitro. *Cancer Res*. 48: 4783-4789, 1988.
27. TREPPEL, J.B., MOYER, J.D., CUTTITTA, F., FRUCHT, H., COY, D.H., NATALE, R.B., MULSHINE, J. L., JENSEN, R.T., SAUSVILLE, E.A. A novel bombesin receptor antagonist inhibits autocrine signals in a small cell lung carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 156:1383-1389, 1988.
28. MAHMOUD, S., PALASZKI, E., FISKUM, G., COY, D.H., MOODY, T.W. Small cell lung cancer bombesin receptors are antagonized by reduced peptide bond analogues. *Life Sci*. 44:367-373, 1989.
29. SZEPESHAZI, K., HALMOS, G., SCHALLY, A.V., *et al*. Growth inhibition of experimental pancreatic cancers and sustained reduction in epidermal growth factor

- receptors during therapy with hormonal peptide analogs. *J Cancer Res Clin Oncol*, 125: 444-452, 1999.
30. ALVARO-ALONSO, I., MUNOZ-ACEDO, G., RODRIGUEZ-MARTIN, E., SCHALLY, A.V., ARILLA, E. Bombesin induces a reduction of somatostatin inhibition of adenylyl cyclase activity, Gi function, and somatostatin receptors in rat exocrine pancreas. *Peptides*, 20:723-730, 1999.
 31. QIN, Y., ERTL, T., CAI, R.Z., HORVATH, J.E., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Antagonists of bombesin / gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW-1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP. *Int. J. Cancer* 63: 257-262, 1995.
 32. RADULOVIC, S., SCHALLY, A.V., REILE, H., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K., GROOT, K., MILOVANOVIC, S., MILLER, G., YANO, T. Inhibitory effects of antagonists of bombesin / gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT – 29 human coloncancers in nude mice. *Acta Oncol* 33: 693-701, 1994.
 33. PINSKI, J., HALMOS, G., YANO, T., *et al.* Inhibition of growth of MKN45 human gastric – carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin / gastrin antagonist (RC-3095) and somatostatin analogue RC-160. *Int J Cancer*, 57: 574 - 580, 1994.
 34. QIN, Y., HALM, G., CAI, R.Z., *et al.* Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. *J Cancer Res. Clin Oncol*, 120: 519-528, 1994.
 35. KAHAN, Z., SUN, B., SCHALLY, A.V., *et al.* Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen – independent human breast carcinoma by bombesin / gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II. *Cancer*, 88: 1384-1392, 2000.
 36. YANO, T., PINSKI, J., SZEPEHAZI, K., *et al.* Inhibitory effect of bombesin / gastrin releasing peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF – 7MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer*, 73:1229-1238, 1994.
 37. SZEPEHAZI, K., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., *et al.* A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10913-10918, 1997.
 38. PINSKI, J., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K. Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin / gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC – 3 human prostate cancer xenografts in nude mice. *Int J Cancer*, 55: 963 -967, 1993.
 39. PINSKI, J., REILE, H., HALMOS, G., GROOT, K., SCHALLY, A.V. Inhibitory effects of somatostatin analog RC – 160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R- 327- AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res.* 54: 169-174, 1994.

40. PINSKI, J., SCHALLY, A.V., HALMOS, G., SZEPEHAZI, K., GROOT, K. Somastostatin analogues and bombesin / gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 54: 5895-5901, 1994.
41. KOZACKO, M.F., MANG, T.S., SCHALLY, A.V., PRIORE, R.L., LIEBOW, C. Bombesin antagonist prevents CO₂ laser – induced promotion of oral cancer. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 93: 2953-2957, 1996.
42. CAI, R.Z., REILE, H., ARMATIS, P., SCHALLY, A.V. Potent bombesin antagonists with C-terminal Leu – psi (CH₂- N)-Tac-NH₂ or its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12664-12668, 1994.
43. PINSKI, J., YANO, T., REKASI, Z., *et al.* High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. *Regul Pept*, 41:3, 185-193, 1992.
44. SIEGFRIED, J.M., KRISHNAMACHARY, N., GAITHER, Davis A., *et al.* Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm Pharmacol Ther*, 12:291-302, 1999.
45. SUN, B., HALMOS, G., SCHALLY, A.V., WANG, X., MARTINEZ, M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*, 42(4):295-303, 2000.
46. CHATZISTAMOU, I., SCHALLY, A.V., SUN, B., ARMATIS, P., SZEPEHAZI, K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer*, 83: 906-913, 2000.
47. KIARIS, H., SCHALLY, A.V., SUN, B., ARMATIS, P., GROOT, K. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin – releasing peptide. *Oncogene*, 25; 18:7168-7173, 1999.

CONCLUSÃO

1 CONCLUSÃO GERAL

Considerando-se os níveis de dose de RC-3095 estudados, não foram observados efeitos tóxicos significativos nos pacientes incluídos neste estudo até o presente momento. Portanto, o uso experimental de RC-3095 em seres humanos é factível no que diz respeito à sua segurança, embora limitações técnicas relacionadas à sua atual formulação para uso humano impeçam a continuidade de sua avaliação. Pela relevância científica e originalidade de seu mecanismo de ação, pela ausência de toxicidade clínica significativa e pelas evidências preliminares de um potencial efeito terapêutico neste estudo de Fase I, o autor recomenda a realização de novos estudos dos aspectos farmacêuticos do RC-3095, os quais viabilizem a continuidade deste estudo.

2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- a) Os estudos toxicológicos confirmatórios realizados em camundongos e ratos corroboram dados anteriores quanto à segurança do RC-3095 nas doses recomendadas para que sejam iniciados estudos clínicos de Fase I.
- b) Nos cinco níveis de dose administrados neste estudo clínico de Fase I com o RC-3095 em pacientes com tumores sólidos avançados refratários não foram documentados efeitos tóxicos significativos. Em consequência, não pode ser identificada uma DMT desse agente até o presente momento.
- c) Não foram detectadas variações significativas nos níveis de gastrina no plasma após a administração do RC-3095, as quais pudessem ser atribuídas a um efeito do

composto em estudo. Em conseqüência, ainda não pode ser determinada com segurança uma DMO desse agente no presente estudo.

- d) Ainda que não tenham sido documentadas respostas tumorais objetivas com o uso de RC-3095, pôde ser observado um caso de regressão tumoral temporária associada à melhora sintomática.
- e) Problemas de ordem logística quanto à formulação farmacêutica do RC-3095 impediram a continuidade do seu escalonamento de dose, levando à suspensão do estudo até que tais problemas sejam solucionados.

COMENTÁRIOS FINAIS

O estudo do RC-3095 representa um marco na investigação de novas estratégias terapêuticas no combate ao câncer. Ao contrário do tratamento convencional com o uso dos agentes citotóxicos clássicos, os quais atuam através de mecanismos com baixa seletividade pela célula tumoral e, portanto, apresentam baixo índice terapêutico, essa nova estratégia possui um forte fundamento científico.

Andrew Schally, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1977 em reconhecimento à sua contribuição para o estudo dos fatores de liberação hipotalâmica na homeostasia do sistema endócrino, dedicou as duas últimas décadas de sua atividade científica na Universidade de Tulane, nos EUA, ao estudo dos mecanismos que regulam o crescimento de células tumorais.

Uma de suas descobertas mais fascinantes diz respeito ao marcado efeito antitumoral exercido por substâncias sintéticas capazes de interferir nos mecanismos responsáveis pela auto-estimulação de células tumorais através de fatores de crescimento e/ou de proliferação. Schally observou que uma série de antagonistas de receptores semelhantes à bombesina apresentava um significativo efeito terapêutico em tumores humanos xenotransplantados em camundongos atímicos, especialmente naqueles cuja presença de expressão aumentada desses receptores na membrana celular indicava a importância dessa via de auto-estimulação no crescimento tumoral.

Nos últimos anos, dezenas de artigos científicos foram publicados confirmando a relevância dessa estratégia terapêutica, sobretudo em tumores de pequenas células de pulmão, mama, próstata, pâncreas e trato gastrointestinal. Mais recentemente, observações semelhantes foram publicadas em modelos de gliomas, ovário e tumores de pulmão de não pequenas células.

O RC-3095 é o primeiro antagonista de receptores do tipo bombesina a fazer parte de estudos clínicos. Para nós, é uma honra termos esse privilégio. A escolha de nosso centro para este estudo representou uma oportunidade ímpar de participarmos de uma pesquisa oncológica realmente inovadora. Ainda que temporária, a observação de uma regressão tumoral em uma paciente submetida ao tratamento com RC-3095 nos deixa muito otimistas. Isto pode significar, nas palavras de Andrew Schally, “a proof of concept!”. Isto significa que o conceito que norteia a estratégia parece funcionar não apenas em modelos no laboratório, mas também em tumores em seres humanos.

Fomos temporariamente limitados por problemas de formulação do composto em estudo, os quais estão sendo solucionados. Em breve, daremos continuidade a este fascinante estudo.

ANEXOS

Anexo I

Critério comum de toxicidade

Anexo II

Avaliação de resposta tumoral

Anexo III

Consentimento livre e esclarecido do paciente para a realização de estudo de Fase I e de farmacocinética clínica do RC-3095, um novo antagonista da bombesina com atividade antitumoral pré-clínica, em pacientes com tumores sólidos avançados.

Anexo IV

Escalas de desempenho clínico

ANEXO I

CRITÉRIO COMUM DE TOXICIDADE

TOXICIDADES	GRAU					
	0	1	2	3	4	
Leucócitos	≥ 4,0	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	< 1	
Plaquetas	normal	75,0 – normal	50,0-74,9	25,0-49,9	< 25,0 g/100ml	
Hb	g/100 ml	normal	10,0 – normal	8,0-10,0	6,5-7,9	< 6,5 g/l
	g/L	normal	100 – normal	80-100	65-79	< 65 mmol/lnormal
	mmol/l	normal	6,2 – normal	4,95-6,2	4,0-4,9	< 4,0
Granulócitos	≥ 2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	< 0,5	
Linfócitos	≥ 2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	< 0,5	
Hemorragia	nenhuma	leve, s/transusão	importante 1-2U, de transfus. por episódio	importante, 3-4U de transf. de transfus. por episódio	massiva, > 4U (clínica) de transf. por episódio	
Infecção	nenhuma	leve	moderada	severa	em risco de vida	
Náusea	nenhuma	capaz de comer razoável quantidade	ingesta significativa reduzida	nenhuma ingesta significativa	—	
Vômitos	nenhum	1 episódio em 24 h	2-5 episódios em 2 h	6-10 episódios em 24 h	> 10 episódios em 24 h ou suporte parenteral	
Diarréia	nenhuma	↑ de 2-3 evacuação/dia	↑ de 4-6 evacuaç/dia ou noturnas, ou cólica moderada	↑ de 7-9 evacuaç/dia ou incontinência ou cólica severa	↑ de ≥ 10 evacuaç/ dia ou melena, ou necessidade de suport.parenter	
Estomatite	nenhuma	úlceras indolores, eritema ou sensibilidade	eritema doloroso, edema ou úlceras, mas pode comer	eritema doloroso, edema ou úlceras e não pode comer	requer suporte ou alimentação parenteral	
Bilirrubina	normal	idem	< 1,5 x normal	1,5-3,0 x normal	> 3,0 x normal	
Transaminases (SGOT, SGPT)	normal	≤ 2,5 x normal	2,6-5,0 x normal	5,1-20,0 x normal	> 20,0 x normal	
Fosfatase Alcalina ou 5' nucleotidase	normal	≤ 2,5 x normal	2,6-5,0 x normal	5,1-20,0 x normal	> 20,0 x normal	
Hepático clínico	s/ alteração dos exames iniciais	—	—	pré-coma	coma hepático	
Creatinina	normal	< 1,5 x normal	1,5-3,0 x N	3,1-6,0 x N	> 6,0 x N	
Proteinúria	nenhuma alteração	1 + ou < 0,3 g% ou < 3 g/l	2-3+ ou 0,3-1,0 g% ou 3-10 g/l	4+ ou > 1,0 g% ou > 10 g/l	síndrome nefrótica	
Hematúria	negativo	microsc. somente	macroscóp. s/coágulos	macroscóp. c/ coágulos	exige transfusão	
Alopécia	s/ perda	leve perda do cabelo	pronunciada ou perda total	—	—	

TOXICIDADES	GRAU				
	0	1	2	3	4
Pulmonar	s/ alterações	assintomático, c/ anormal. em PFP	dispnéia em esforço importante	dispnéia em atividade normal	dispnéia em repouso
Cardíaca Arritmias	s/ alterações	assintomático, transitório, s/ trat.	recorrente ou persistente, s/ trat.	requer tratamento	requer monitorização ou hipotensão, taquic, vent. ou fibrilação
Cardíaca Função	s/ alterações	assintomático, declínio 20% do FEVE em repouso	sintomático, declínio 20% do FEVE em repouso	leve ICC, s/ tratamento	ICC severa ou refratária
Cardíaca Isquemia	s/ alterações	alt. não sepecific. da onda T T	assintomático, alt. ST e sugerem isquemia	angina, sem evidências de IAM	IAM
Cardíaca Pericárdio	s/ alterações	derrame assintomático não requer intervenção	pericardite	derrame sintomático requer drenagem	tamponamento, drenagem urgente
Hipertensão	s/ alterações	assintomático, ↑ transitória > 20 mmHg ou PA > 150/100 com PA prévia normal	recorrente ou persistente ↑ de > 20 mmHg ou PA > 150/100 com PA prévia normal	requer tratamento	crise hipertensiva
Hipotensão	s/ alterações	anormalidades não requerem trat.	exigência de reposição hídrica ou outras, sem hospitalização	exigência de trat. ou hospitaliz. < 48 h após interrupção do agente	exigência de hospitaliz. > 48 h após interrupção do agente
Neuro-sensório	s/ alterações	parestesia leve ou perda dos reflexos tendinosos profundos	parestesia moderada perda objetiva leve ou moderada	parestesia que interfere, com função ou perda sensorial objetiva	—
Neuro-motor	s/ alterações	fraqueza subjetiva s/ achados objetivos	fraqueza objetiva leve sem perda de função significativa	fraqueza objetiva, com perda de função	paralisia
Neuro-cortical	s/ alterações	leve sonolência ou agitação	sonolência moderada ou agitação	sonolência severa, agitação, confusão desorientação, alucinações	coma, convulsões, psicose tóxica
Neuro-cerebelar	s/ alterações	descordenação leve disdiadococinese	tremor de intenção, dismetria, fala alterada, nistagmo	ataxia motora	necrose cerebelar
Neuro-humor	s/ alterações	ansiedade leve ou depressão	ansiedade moderada ou depressão	ansiedade severa ou depressão	ideação suicida
Neuro-cefaléia	nenhuma	leve	moderada ou severa, mas transitória	severa e persistente	—
Neuro-constipação	s/ alterações	leve	moderada	severa	íleo > 96 h
Neuro-audição	normal	assintomático, perda da audição audiométrica somente	tínitus	perda da audição com interferência da função mas corrigível com aparelhos	surdez não corrigível

TOXICIDADES	GRAU				
	0	1	2	3	4
Neuro- visão	s/alterações	—	—	perda parcial da sintomática da visão	cegueira
Pele	s/alterações	erupções maculares ou papulares esparsas ou eritema assintomático	erupções maculares ou papulares ou eritema com prurido	erupções maculares ou papulares ou eritema ou vesiculares generalizadas, sintomáticas	dermatite esfoliativa ou ulcerada
Alergia	nenhuma	rash transitório febre < 38°C	urticária, febre = 38°C, broncoespasmo leve	doença sérica, broncoespasmo, req meds parenteral	choque anafilático
Febre na ausência de infecção	nenhuma	37,1-38,0°C	38,1-40,0C < 24 h	> 40,0°C	> 40,0°C > 24 h

TOXICIDADES	GRAU				
	0	1	2	3	4
Local	Nenhum	dor	dor e edema com inflamação ou flebite	ulceração	cirurgia plástica indicada
Peso ganho/perda	<5,0%	5,0-9,9%	10,0-19,9%	≥ 20,0%	—
Hiperglicemia	<116 mg/dl	116-160 mg/dl	161-250 mg/dl	251-500 mg/dl	>500 mg/dl ou cetoacidose
Hipoglicemia	>64 mg/dl	55-64 mg/dl	40-54 mg/dl	30-39 mg/dl	<30 mg/dl
Amilase	normal	< 1,5 x normal	1,5-2,0 x normal	2,1-5,0 x normal	>5,1 x Normal
Hipercalemia	< 10,6 mg/dl	10,6-11,5 mg/dl	11,6-12,5 mg/dl	12,6-13,5 mg/dl	≥ 13,5 mg/dl
Hipocalcemia	>8,4 mg/dl	8,4-7,8 mg/dl	7,7-7,0 mg/dl	6,9-6,1 mg/dl	≤ 6,0 mg/dl
Hipomagnesemia	> 1,4 mmol/l	1,4-1,2 mmol/l	1,1-0,9 mmol/l	0,8-0,6 mmol/l	≤ 0,5 mmol/l
Fibrinogenio	normal	0,99-0,75 x normal	0,74-0,50 x normal	0,49-0,25 x normal	≤ 0,24 x normal
Tempo de Protrombina	normal	1,01-1,25 x normal	1,26-1,50 x normal	1,51-2,00 x normal	>2,00 x normal
Tempo de Tromboplastina parcial	normal	1,01-1,66 x normal	1,67-2,33 x normal	2,34-3,00 x normal	>3,00 x normal

ANEXO II

AVALIAÇÃO DE RESPOSTA TUMORAL

Tipo de resposta	Descrição
Completa	Desaparecimento das lesões por pelo menos 4 semanas, com comprovação histopatológica da ausência do tumor.
Parcial	Redução de pelo menos 50% do tamanho de todas lesões mensuráveis por, pelo menos, 4 semanas.
Menor	Redução das lesões em mais de 25%, porém menor que 50%, sem que haja evidência de progressão da doença.
Doença estável	Ausência de crescimento de mais de 25% do tamanho das lesões, sem evidência de aparecimento de novas lesões.
Progressão	Crescimento maior do que 25% das lesões ou surgimento de novas lesões durante o tratamento.

ANEXO III

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDO DE FASE I E DE FARMACOCINÉTICA CLÍNICA DO RC-3095, UM NOVO ANTAGONISTA DA BOMBESINA COM ATIVIDADE ANTITUMORAL PRÉ-CLÍNICA, EM PACIENTES COM TUMORES SÓLIDOS AVANÇADOS.

Estudo SOAD # 09715**Prezado Paciente:**

Você recebeu o diagnóstico de um tumor maligno e seus médicos concluíram que o seu tumor não pode ser removido através de uma cirurgia, mas acreditam que o tratamento com uma nova droga chamada “antagonista da bombesina (RC-3095)” pode ajudá-lo. Portanto, gostaríamos de lhe oferecer esse tratamento que ainda se encontra em estudo.

Informações sobre a droga:

O antagonista da bombesina (RC-3095) é uma nova droga anticâncer que, em estudos feitos em animais, demonstrou ter bons resultados na diminuição dos tumores, sendo esses testes muito importantes na escolha de uma droga que possa funcionar em tumores que são encontrados também nos seres humanos.

Objetivo do estudo:

A pesquisa para qual você está sendo convidado(a) a participar é um estudo com os seguintes objetivos:

- Determinar os efeitos colaterais da droga antagonista da bombesina (RC-3095).
- Estudar a farmacocinética clínica do RC-3095 na população em estudo, ou seja, verificar, através de coletas de sangue do paciente, quanto tempo a droga permanece no seu organismo, permitindo, assim, identificar o período de ação da droga no organismo.
- Avaliar a possibilidade terapêutica em pacientes com tumores sólidos.

Andamento do estudo:

Se você concordar em participar do estudo, o seu médico precisará realizar vários exames, incluindo exames de sangue e, possivelmente, exames de raio X, tomografias e/ou ecografias.

É possível que você já tenha realizado alguns ou todos esses exames, mas em alguns momentos será necessário realizá-los novamente. Semanalmente serão realizados:

- uma consulta ambulatorial, para avaliação do seu estado físico geral;
- uma coleta de sangue para exames laboratoriais.

Ao término de cada ciclo, ou seja, a cada 3 semanas, serão realizados:

- uma coleta de sangue para a realização do hemograma, conforme descrito acima, e bioquímica para avaliação do funcionamento do fígado e dos rins.

Você receberá a droga RC-3095 para ser administrada através de uma injeção subcutânea, durante todos os dias, por 3 semanas (1º ciclo). O tratamento continuará diariamente sem intervalos nos ciclos subsequentes. É importante salientar que não foram observados efeitos colaterais no estudo realizado em animais; porém, apenas em alguns casos observaram-se sinais de uma espécie de alergia nos locais de aplicação das injeções.

A avaliação semanal será importante para identificarmos o mais cedo possível qualquer reação que você possa ter. Os efeitos colaterais serão cuidadosamente avaliados e tratados quando houver necessidade. Caso esses efeitos colaterais ocorram, não irão necessariamente causar mudanças no curso do tratamento.

Por favor, informe imediatamente a equipe (seja seu médico ou a enfermeira que o/a acompanha) sobre quaisquer efeitos que surgirem para que sejam tomadas as devidas precauções quanto ao prosseguimento do seu tratamento.

Em caso de qualquer dúvida, você pode entrar em contato com a nossa equipe pelo telefone: (51) 316-8012.

Custo do tratamento:

Os pacientes participantes do estudo serão acompanhados de acordo com a rotina de atendimento ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O fornecimento da medicação e o tratamento não trarão nenhum custo financeiro ao paciente.

Proteção dos dados obtidos através do estudo:

Durante o tratamento, as informações obtidas através dos exames realizados serão comparadas com as de outros pacientes no mesmo estudo e utilizadas para análise dos resultados do tratamento. Somente as informações serão utilizadas, sendo que o seu nome e as suas informações pessoais não serão identificados, mantendo-se a confidencialidade.

Solicitamos também que, caso você concorde em participar deste estudo, assine o documento em anexo de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, datada de outubro de 1996, a qual assegura a proteção dos pacientes envolvidos em pesquisa biomédica.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética desta Instituição, que garantiu sua aprovação quanto ao conteúdo ético deste trabalho.

Eu, abaixo assinado, _____,

confirmando que fui informado pelo médico _____

quanto aos riscos, aos benefícios e aos possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes do tratamento. Apresento, pois, meu livre consentimento para participar deste estudo. A qualquer momento, posso optar por abster-me dele sem motivo especial e sem qualquer prejuízo aos cuidados que tenho o direito de receber.

_____ Data: ___/___/___
(assinatura do paciente)

_____ Data: ___/___/___
(assinatura do investigador)

Assinatura do paciente, com a assinatura do médico, com dizeres "lido e aprovado" escritos acima da mesma.

_____ Data: ___/___/___

Assinatura de uma terceira pessoa (se necessário): nome, sobrenome e posição com os dizeres "lido e aprovado", escritos acima da mesma, à mão.

ANEXO IV

ESCALAS DE DESEMPENHO CLÍNICO

		ESCALAS	
KARNOFSKY			ZUBROD-ECOG-WHO
Normal, sem queixas.	100	0	Atividade normal.
Capaz de realizar as atividades normais. Sinais e sintomas leves da doença.	90		
		1	Sintomas, mas quase ambulatorial.
Atividade normal com esforço.	80		
Necessita de cuidados. Incapaz para atividade normal ou para trabalho ativo.	70	2	Algum tempo acamado, mas em período inferior a 50% do dia normal.
Requer ocasional assistência, mas é capaz de cuidar-se para as suas necessidades.	60		
Requer considerável assistência e cuidados médicos freqüentes.	50	3	Necessita estar na cama mais do que 50% do dia normal.
Incapacitado. Requer cuidado e assistência especial.	40		
Gravemente incapacitado. Hospitalização indicada apesar de morte não-iminente.	30	4	Incapaz de sair da cama.
Muito doente. Hospitalização necessária. Ativo tratamento suportivo necessário.	20		
Moribundo	10		
Morte	0		