

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA

**OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A FARMACOCINÉTICA
E A FARMACODINÂMICA DO RC-3095 - UM NOVO
ANTAGONISTA DA BOMBESINA/FATOR DE LIBERAÇÃO DA
GASTRINA, EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS
SÓLIDAS AVANÇADAS**

PORTO ALEGRE

2006

FABIANO HAHN SOUZA

**OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A FARMACOCINÉTICA
E A FARMACODINÂMICA DO RC-3095 - UM NOVO
ANTAGONISTA DA BOMBESINA/FATOR DE LIBERAÇÃO DA
GASTRINA, EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS
SÓLIDAS AVANÇADAS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Sul para
obtenção do Título de Mestre em
Bioquímica.**

Orientador: Dr. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Fabiano Hahn

Observações preliminares sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica do RC-3095 – um novo antagonista da bombesina/fator de liberação da gastrina, em pacientes portadores de neoplasias sólidas avançadas./ Fabiano Hahn Souza. - - Porto Alegre, 2006.

119f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas e Bioquímica.

Preliminaries observations about pharmacokinetic and pharmacodynamic of RC-3095 – a novel BN/GRP antagonist in patients with advanced solid malignancies.

1. Antagonista da bombesina/GRP 2. RC-3095 3. Estudo de fase I 4. Tumores sólidos 5. Farmacocinética

“Um pensamento sem ação é um sonho. Uma ação sem pensamento é um pesadelo.”

Provérbio japonês.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse projeto envolveu a colaboração de várias pessoas sem as quais a sua realização teria sido prejudicada. Entre elas, quero agradecer especialmente:

Ao meu orientador, professor e mentor Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann pela oportunidade, ensinamentos e pelo convívio ao longo desses anos. Dr. Gilberto mostrou-me com seu exemplo de vida, desde os tempos da graduação, que é possível fazer uma ciência de excelente qualidade no nosso país.

À minha esposa Debora pelo apoio e incentivos constantes ao longo dessa e da nossa caminhada.

Aos meus pais e minha irmã pelo constante suporte afetivo e educacional.

A todos os demais familiares e amigos que de uma maneira ou de outra contribuíram na minha formação como pessoa, em especial aos meus avós (Beatriz *in memória*, Eduardo *in memória* e Eleonora).

As colegas da SOAD, Ana, Patricia, a secretária Rosana e em especial a Luciane pelo apoio e amizade ao longo desse projeto.

A todos os pacientes que participaram do estudo.

Dedico esse trabalho em memória a Susana Procianoy Silva e em especial a memória do grande pai que tive.

ÍNDICE

PARTE 1

i. RESUMOS	1
ii. LISTA DE ABREVIATURAS	3
iii. LISTA DE FIGURAS	5
iv. LISTA DE TABELAS	6
v. INTRODUÇÃO	7
1 Revisão da Literatura	7
1.1 Bombesina e os Peptídeos Liberadores de Gastrina (GRPs)	7
a) Generalidades	7
b) Atividade Biológica	8
c) BNP como Fatores de Crescimento Tumoral	9
1.2 Receptores da Bombesina	13
a) Generalidades	13
b) Associação com EGFR	15
1.3 Antagonistas da Bombesina – RC -3095	17
a) Generalidades	17
b) Efeito Antitumoral	18
c) Toxicidade	20
vi. JUSTIFICATIVA	21
vii. OBJETIVOS DO TRABALHO	22
1 Objetivo Geral	22
2 Objetivos Específicos	22

PARTE 2 – ARTIGOS ORIGINAIS

Artigo 1 - Quantificação do RC-3095, um antagonista da bombesina/peptídeo liberador de gastrina por cromatografia líquida/espectrometria de massa	23
Artigo 2 - Estudo fase I do antagonista do peptídeo liberador de gastrina/bombesina (BN/GRP) RC-3095 em pacientes com tumores sólidos avançados	40

PARTE 3

CONCLUSÕES	72
PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (PARTE 1 E 3)	74

PARTE 4

ANEXOS	87
I.Avaliação da resposta tumoral pela OMS	87
II.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88
III.Escalas de Desempenho Clínico do ECOG	91
IV. Critérios de Toxicidade do NCCT	92
V. Metodologia do Estudo de Novas Drogas Anticâncer	93
VI. Estudos de Toxicidade do RC-3095 em Animais	97
VII. Artigo 1 – Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 by liquid chromatography–tandem mass spectrometry	102
VIII. Artigo 2 - A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies	109

PARTE 1

i. RESUMO

O RC-3095 é um novo antagonista sintético de receptores do tipo bombesina/fator de liberação da gastrina (BN/GRP), que produz longas remissões tumorais em modelos de tumores murinos e humanos. Nesta dissertação são apresentados os resultados de dois estudos relevantes para o início de seu desenvolvimento clínico. No primeiro deles, é descrito o seu método de análise no plasma humano. No segundo, são apresentados os resultados de um estudo de fase I em pacientes com câncer avançado, em que é avaliada sua segurança, bem como aspectos de sua farmacocinética no plasma e efeitos farmacodinâmicos. Vinte e cinco pacientes com tumores sólidos avançados e em progressão receberam RC-3095 diariamente através da via subcutânea em doses que variaram de 8 a 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Foram coletadas amostras de plasma para estudo farmacocinético. Para o estudo farmacodinâmico, foram analisados gastrina, EGF, VEGF, IGF e b-FGF plasmáticos, bem como a expressão de EGFR, VEGFR e GRPR em pele normal e amostras tumorais. Houve apenas desconforto no local da injeção em pacientes tratados nos níveis mais altos de dose. Nenhuma outra toxicidade clínica foi observada no estudo. Nenhuma resposta tumoral objetiva foi documentada. Entretanto, uma regressão tumoral transitória foi observada em uma paciente com carcinoma medular da tireóide, cujo tumor apresentava uma alta expressão de receptores de GRP. Dois pacientes com câncer de próstata avançado obtiveram uma diminuição transitória dos níveis plasmáticos do PSA. Embora uma queda transitória de gastrina plasmática tenha sido demonstrada em alguns pacientes, não houve nenhuma correlação inibitória consistente do uso do RC-3095 em relação a gastrina plasmática. O estudo farmacocinético do RC-3095 mostrou uma meia-vida de eliminação de cerca de 8 horas. Uma dose do RC-3095 de 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produziu uma diminuição de 50% nos níveis de gastrina plasmática em um paciente hipergastrinêmico com a Síndrome de Zollinger-Ellison. O desconforto no local da injeção foi a única toxicidade dose limitante (TDL). Considerando o seu mecanismo de ação inovador e a sua baixa toxicidade sistêmica, futuros estudos clínicos com o RC-3095 deverão ser iniciados.

Abstract

The novel BN/GRP synthetic receptor antagonist, RC-3095, was able to produce long-lasting tumor remissions in various murine and human tumor models. In this paper we present the results of two important studies of the beginning of its clinical development. The first one, it was described a method for quantification of RC-3095 in human plasma. The second paper shows the results of a phase I trial in patients with advanced cancer, with respect of safety profile, as well as pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Twenty-five patients with advanced and progressive solid tumors received RC-3095 daily by subcutaneous route at doses ranging from 8 to 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ according to a phase I methodology. Plasma samples were collected for pharmacokinetic studies. For the study of pharmacodynamic effects on RC-3095, plasma gastrin, EGF, VEGF, IGF and b-FGF levels, as well as EGFR, VEGFR and GRPR expression in normal skin and tumor samples were analyzed. Except for the occurrence of local discomfort at the injection site in patients treated at the highest dose levels, no other clinical toxicity was observed in the study. No objective tumor responses were documented. A minor response was observed in a patient with medullary carcinoma of the thyroid, who showed a high expression of GRPR in the tumor. Two patients with advanced prostatic cancer showed transient decrease in plasma PSA levels. Although a transient inhibitory effect was observed in some patients, there was no consistent inhibitory effect of RC-3095 on plasma gastrin or growth-factor levels in plasma. The plasma pharmacokinetics of RC-3095 showed an elimination half-life of about 8 hours. The dose of RC-3095 was 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was able to produce a decrease in plasma gastrin levels down to 50% of basal levels in a clearly hyper-gastrinemic individual with the Zollinger-Ellison syndrome. The dose-limiting toxicity was local discomfort at the injection site. Local discomfort at the injection site is the only dose-limiting toxicity. Considering its novel mechanism of action and its low systemic toxicity, further trials with RC-3095 are warranted.

ii. LISTA DE ABREVIATURAS

AUC	Área abaixo da curva
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto Beta
BN	Bombesina
BNP	Peptídeos Relacionados a Bombesina
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
Cl_F_obs	<i>Clearance</i> Corporal Total
Cmax	Concentração Máxima
CPPC	Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células
CPNPC	Carcinoma Pulmonar Não de Pequenas Células
CQ	Controle de Qualidade
d.i.	Diâmetro Interno
DMT	Dose-Máxima Tolerada
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
Egr-1	Proteína de Resposta ao Crescimento Precoce-1
ErbB-2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico-2
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GRP	Peptídeo Liberador de Gastrina
GRPR	Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IGF-I	Fator de Crescimento tipo Insulina-1
IGF-II	Fator de Crescimento tipo Insulina-2
IP3	Trifosfato de Inositol
INF	Inferior
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida com Espectrômetro de Massa
LHRH	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
LQ	Limite de Quantificação
MAPK	Cinase Protéica Mitógena Ativada
MMP-9	Metaloproteinase-9
MMR	Monitoração de Múltiplas Reações
MS-MS	Espectrometria de Massa
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
NMB	Neuromedina-B
NMBR	Receptor de Neuromedina-B
NMC	Neuromedina-C
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Salina de Fosfato
PSA	Antígeno Prostático Específico
PKC	Proteína Cinase C
RNA _m	Mensageiro do Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SC	Subcutâneo

SNC	Sistema Nervoso Central
SOAD	<i>South-American Office for Anticancer Drug Development</i>
$t_{1/2}$	Tempo de Meia-vida Biológica da Droga
TDL	Toxicidade Dose-Limitante
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGF α	Fator de Crescimento Transformador Alfa
TGI	Trato Gastrointestinal
Tmax	Tempo de Pico da Concentração Máxima da Droga
VEGF	Fator de Crescimento Epidérmico Vascular
VEGFA	Fator de Crescimento Epidérmico Vascular-A
Vz_F_obs	Volume de Distribuição Aparente

iii. LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Estrutura do RC-3095.....17

Artigo 1

Figura 1. Espectro de massa de todo peptídeo RC-3095 (A) e seus respectivos espectros de produtos iônicos.....32

Figura 2. Proposta das vias de fragmentação de massa do peptídeo RC-3095.....33

Figura 3. Cromatograma das monitorações de múltiplas reações (MMR) do RC-3095.....34

Figura 4. Média dos níveis plasmáticos do RC-3095 seguido da administração subcutânea de dois pacientes com câncer (96 $\mu\text{g}/\text{kg}$).....37

Artigo 2

Figura 1. Estrutura da Bombesina e da Família dos Peptídeos Liberadores de Gastrina.....46

Figura 2. Níveis de Gastrina Plasmática seguida da Administração do RC-3095 (96µg/kg SC) em um Paciente com Síndrome de *Zollinger-Ellison*.....60

Figura 3. Concentração Plasmática versus Curva de Tempo em Pacientes que Receberam RC-3095 por Administração SC na Dose de 96 µg/kg.....62

Figura 4. Coloração Anti-GRPR em Tumores.....63

iv. LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Condições do gradiente da fase móvel.....28

Tabela 2. Curva de calibração da validação do RC-3095.....35

Tabela 3. Validação com controles de qualidade (CQ) contendo os resultados de acurácia e precisão do peptídeo RC-3095.....36

Artigo 2

Tabela 1. Características dos pacientes incluídos no Estudo de Fase I do RC-3095.....56

Tabela 2. Esquema de escalonamento de dose aplicado no Estudo de Fase I do RC-3095.....57

Tabela 3. Incidência de toxicidades relacionados ao RC-3095.....58

Tabela 4. Parâmetros Farmacocinéticos em dois pacientes que receberam RC-3095 por via SC uma vez ao dia no maior Nível de Dose (Nível VII, 96 µg/kg).....61

v. INTRODUÇÃO

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Bombesina e peptídeos liberadores de gastrina

a) Generalidades

A bombesina (BN) é um peptídeo de 14 aminoácidos (Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) que foi originalmente isolado da pele do sapo europeu *Bombina bombina* (Anastasi *et al.*, 1971) e pertence à família de peptídeos que não é somente caracterizada em anfíbios, mas também em mamíferos (Zachary *et al.*, 1987). Estudos imunohistoquímicos mostram a presença de imunorreatividade tipo-BN no SNC e TGI em várias espécies, incluindo ratos, porcos, cães e humanos (Chronwall *et al.*, 1985; Panula *et al.*, 1982; Panula *et al.*, 1986). Um análogo da BN, com potente atividade liberadora de gastrina, o GRP, foi caracterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos por McDonald e colaboradores (McDonald *et al.*, 1978). O GRP e a BN têm em comum nove de dez aminoácidos C-terminais.

A imunorreatividade em mamíferos deve-se aos seguintes peptídeos relacionados a BN, identificados posteriormente: GRP, o NMB e o NMC (Minamino *et al.*, 1983; Minamino *et al.*, 1985). Todos esses peptídeos dividem homologia estrutural nas suas seqüências C-terminais (Dutta *et al.*, 1993; Willey

et al., 1984). GRP é um peptídeo de 27 aminoácidos com quase 100% de homologia com BN nos dez resíduos C-terminais. NMC é idêntico ao domínio C-terminal do GRP, enquanto o NMB difere por três resíduos. Todos esses peptídeos fazem parte da família dos BNP's (Clapham *et al.*, 2001).

b) Atividade Biológica

Os BNP's possuem várias atividades biológicas. Broccardo e colaboradores demonstraram que o nonapeptídeo C-terminal da BN é tão potente quanto o peptídeo natural (Broccardo *et al.*, 1975). A administração exógena dos BNP's desencadeia uma série de respostas em vários órgãos, incluindo a regulação da secreção exócrina e endócrina do TGI, a contração da musculatura lisa, pressão sanguínea, glicemia plasmática, temperatura corporal e crescimento celular (Lebacqz-Verheyden *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1987). A BN é biologicamente ativa no SNC, onde funciona como neuromodulador alterando a ingestão alimentar, o comportamento, a secreção de hormônio pituitário (Gibbs *et al.*, 1979; Merali *et al.*, 1983; Westendorf e Schonbrun, 1983) e também tem um importante papel como neurotransmissor no pâncreas exócrino (Holst *et al.*, 1989; Knuhtsen *et al.*, 1985).

Acredita-se que o NMB e o GRP têm ação biológica periférica e central como crescimento autócrino, saciedade, termorregulação, comportamento estereotipado, estresse, ansiedade/depressão, agindo em receptores específicos (Kent *et al.*, 1997).

O CPPC secreta uma infinidade de agentes vasoativos. Sabe-se que pacientes portadores de CPPC sofrem de um intenso estresse pulmonar com sintomas de dispnéia, dor torácica entre outros. Foi estudado o papel dos BNPs na gênese desses sintomas. Os autores conjecturaram que os BNPs aumentam a quimiossensibilidade nos terminais nervosos pulmonares. Em um modelo experimental em ratos, ficou demonstrado que a BN e o GRP fazem uma regulação para cima dessa sensibilidade quimioreflexa *in vivo* (Gu e Lee, 2005).

Mais recentemente, nosso grupo descreveu pela primeira vez a ligação dos BNPs com modelo experimental de sepse *in vitro* e *in vivo* e foi demonstrado que o uso do antagonista dessa via pró-inflamatória melhora a sobrevivência dos animais com sepse estabelecida (Dal-Pizzol *et al.* 2005).

c) BNP como Fatores de Crescimento Tumoral

Os BNPs podem atuar como mitógenos, alterando a proliferação das células normais e malignas, como demonstrado em linhagens celulares de CPPC e CPNPC (Moody *et al.* 1981; Carney *et al.*, 1987) e células de Swiss 3T3 *in vitro* (Rozengurt *et al.*, 1983). Em várias neoplasias humanas, como CPPC, câncer de pâncreas, de mama, de próstata, gástrico e de útero (Fleischmann *et al.*, 2005), entre outras, os BNPs parecem estimular o crescimento e funcionam como fatores de crescimento autócrino (Zachary *et al.*, 1987; Moody *et al.*, 1981; Rozengurt *et al.*, 1983; Cuttitta *et al.*, 1985a; Cuttitta *et al.*, 1985b).

Um grupo de pesquisadores americanos documentou que GRP e NMB são fatores de crescimento autócrino para CPNPC (Siegfried *et al.*,1999). Esse estudo sugere que a produção do NMB e a expressão do NMBR podem ser mais potentes que a produção do GRP e a expressão do GRPR. Previamente, o NMB tinha sido detectado por imunohistoquímica em CPNPC (Cardona *et al.*,1991; Giaccone *et al.*,1992).

Recentemente, Thomas e colegas demonstraram que é possível ativar o EGFR pela ligação do GRPR em CPNPC. O GRP induz uma rápida ativação das células neoplásicas via MAPK p44/42 através do EGFR (Thomas *et al.*, 2005).

Gokhale e colaboradores, estudando linhagens de câncer gástrico humano, encontraram evidências de participação da BN na proliferação dessas células através da estimulação autócrina (Gokhale *et al.* 1995). Tatsuda demonstrou, em modelo animal de câncer gástrico induzido pela N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, que a injeção de BN induziu um aumento da incidência de metástase peritoneal (Tatsuta *et al.*, 2001).

Outro grupo, ao estudar o papel da BN em câncer de mama, detectou um alto percentual de receptores de BN em tecido mamário neoplásico (Gugger e Reubi, 1999). Bold e colaboradores demonstraram que a BN tem efeito trófico em células de câncer de mama estrógeno-dependente (Bold *et al.*,1998) e Bajo e colegas demonstraram esse mesmo efeito em linhagem de câncer de mama estrógeno-independente (Bold *et al.*,1998; Bajo *et al.*, 2002).

Esse efeito trófico também foi demonstrado em linhagem de células tumorais pancreáticas (Wang *et al.*,1996) e prostáticas (Han *et al.*,1995). Estudos publicados por Markwalder e Reubi (Markwalder e Reubi, 1999) e Sun e colaboradores (Sun *et al.*, 2000) identificaram uma expressiva presença de receptores de BN/GRP em células tumorais prostáticas, sugerindo a participação destes na modulação da progressão tumoral. Posteriormente, Dai e colegas demonstraram que a BN pode ser sinérgica com baixos níveis de testosterona (castração) em induzir transcrição mediada pelos receptores de andrógeno, sugerindo que esse neuropeptídeo possa promover a sinalização dos receptores de andrógeno no câncer de próstata androgênio-independente (Dai *et al.*,2002).

Um grupo italiano descreveu que a BN induz a ativação da MMP-9 via subunidade $\beta 1$ da integrina. Esses achados suportam a idéia de que resposta celular aos fatores de crescimento podem desencadear interação célula-matriz, sugerindo que o sistema neuroendócrino possua um papel na progressão da neoplasia prostática (Festuccia *et al.*,2002). Todavia, foi um experimento de Levine e colaboradores que mostrou que a BN estimula o $NF \kappa B$ e a expressão do gene pró-angiogênico em células de câncer de próstata hormônio resistente. Esses dados sugerem um possível mecanismo molecular entre a associação da diferenciação células neuroendócrinas e o aumento do potencial metastático no câncer de próstata andrógeno-resistente (Levine *et al.*, 2003).

Xiao e colaboradores descreveram que a BN induz a expressão da ciclina D1 humana na linhagem de câncer de próstata DU-145. Até então,

acreditava-se que a ciclina D1 – crítica reguladora do ciclo celular – estimulasse o mitogênio via ativação do sinal de cinase ativado. Esse efeito da BN é mediado pela Egr-1. Os achados representam um novo mecanismo BN-dependente de estímulo mitogênico pela regulação direta no ciclo celular em câncer de próstata (Xiao *et al.*, 2005).

O mesmo foi verificado no câncer de cólon humano por Saurin e colaboradores (Saurin *et al.*, 1999), bem como por Chaves e colaboradores (Chave *et al.*, 2000). Mais tarde, Saurin demonstrou o potencial de invasão e metastatização de linhagens de câncer de cólon pela expressão de GRPR (Saurin *et al.*, 2002). Um outro estudo grego avaliou a aparência ultra-estrutural de biópsias em espelho de adenocarcinomas intestinais. Foi descrita secreção ectópica da BN entre outras substâncias vasoativas nessas amostras, indicando uma natureza pré-neoplásica desses tecidos (Seretis *et al.*, 2004).

Pesquisadores suíços demonstraram que a transformação maligna do tecido renal humano é acompanhada pela nova expressão de GRPR (Pansky *et al.*, 2000). Um outro grupo descreveu em linhagens de melanoma humano a imunorreatividade de GRP em todos os tipos de melanoma. Foi sugerida uma possível ligação com GRP e a patofisiologia desses tumores (Charitopoulos *et al.*, 2000).

Em 2002, foi demonstrada a relação dos GRPR em CECP como um possível marcador precoce da neoplasia. Foram estudados 25 amostras de tumores e tecidos peritumorais de indivíduos com CECP, com amostras

teciduais de indivíduos sem câncer. Foram encontrados níveis 6 e 4 vezes maiores de expressão de RNAm de GRPR nos tumores e tecidos peritumorais, respectivamente, em comparação aos controles (Lango *et al.*, 2002). O mesmo grupo, posteriormente, descreveu que o GRP induz rápida fosforilação do EGFR assim como da MAPK p44/42. Usando vários inibidores da tirosina cinase específicos do EGFR, ficou evidente que o GRP induzia a ativação da MAPK p44/42 por uma via dependente da ativação do EGFR. Outros experimentos evidenciaram que a quebra do TGF α por metaloproteinases de matriz mediavam a ativação da MAPK via GRP. Esses resultados comprovam que o efeito mitogênico do GRP nos CECP é mediado extracelularmente pela liberação de TGF α e requer ativação dependente do EGFR pela via MAPK dependente (Lui *et al.*, 2003). Recentemente, Zhang e colegas sugeriram que a família de cinases Src contribui para o crescimento do EGFR mediado pelo GRP, facilitando a quebra e a liberação do TGF α e antiregulina no CECP. Isso deve estar ligado ao potencial de invasão do tumor (Zhang *et al.*, 2004).

1.2 Receptores da Bombesina

a) Generalidades

Os receptores de BN foram identificados funcional e estruturalmente em vários sistemas biológicos. Eles estão localizados principalmente no SNC, medula espinhal, TGI (Sunday *et al.*, 1988) e em células neuroendócrinas pulmonares (Wharton *et al.*, 1978). Além disso, tumores carcinóides pulmonares

e CPPC expressam imunorreatividade positiva para BN (Moody *et al.*,1981; Yang *et al.*, 1983).

Atualmente, cinco tipos de receptores tipo BN foram clonados – GRPR, NMBR, BRS-3, BB4R e o BRS-3.5. Spindel e colegas clonaram GRPR a partir de células murinas 3T3. A análise da seqüência dos 384 aminoácidos desse receptor evidenciou sete domínios hidrofóbicos transmembrana, indicando que esse é um receptor membro da família de receptores acoplados a proteína G (Spindel *et al.*, 1990; Battey *et al.* 1991). Subseqüentemente foi clonado o NMBR de esôfago de rato. As propriedades desse receptor são diferentes das do GRPR. O NMBR mostra maior afinidade de ligação NMB do que GRP quando expresso em células 3T3 murinas.

Esses receptores dividem entre 40 e 50% de similaridade de aminoácidos, sendo classificados de acordo com sua preferência em ligação com GRP (GRPR) e NMB (NMBR), ou simplesmente através da homologia com esses 2 receptores, como no caso dos receptores subtipo BRS-3 (Fathi *et al.*, 1993; Ohki-Hamazaki *et al.*,1997; Spindel *et al.*,1993), BB4R (Spindel *et al.*, 1993; Nagalla *et al.*, 1995) e BRS-3.5 (Iwabuchi *et al.*, 2003).

Ambos, NMBR e GRPR estão envolvidos na ativação da fosfolipase C, na geração de IP3, na liberação de cálcio intracelular (Moody *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 1991) e na ativação da PKC, a qual fosforila substratos protéicos citosólicos (Draoui *et al.*, 1993; Fathi *et al.*,1996). A MAPK é ativada, levando a um aumento nuclear da expressão de oncogenes (Moody *et al.*, 1986).

Wada e colaboradores desenvolveram um modelo de ratos sem GRPR (Wada *et al.*, 1998) para determinar as funções *in vivo* destes receptores. Ratos

deficientes de GRPR exibem fenótipos comportamentais de aumento da atividade espontânea e uma resposta social elevada (Wada *et al.*, 1997). Resultados de Yamada e colegas (Yamada *et al.*, 1999) sugeriram que a expressão do gene de BRS-3 no núcleo parabraquial é importante para a modulação de preferência de paladar, assim como também para o desenvolvimento da obesidade. Ratos recentemente NMBR deficientes foram desenvolvidos por Ohki-Hamazaki e colegas (Ohki-Hamazaki *et al.*, 1999).

Os receptores de BN são filogeneticamente conservados. O GRPR e o NMBR foram clonados de várias espécies. A seqüência de aminoácidos do GRPR e do NMBR entre as espécies é bem conservada. A homologia é mais de 90% entre os mamíferos e mais de 80% entre aves e mamíferos. Similarmente, o BRS-3 tem uma homologia de 84% entre os mamíferos. Esses achados indicam que esses receptores são evolutivamente conservados.

b) Associação com EGFR

EGF é um fator de crescimento que se liga com alta afinidade ao seu receptor específico transmembrana EGFR (Gill *et al.*, 1987). Uma vez ativado, o receptor transmite sinais mitogênicos para o núcleo da célula por fosforilação do seu próprio resíduo de tirosina e de outras proteínas intracelulares (Ullrich *et al.*, 1990). Foi descrito que a BN/GRP fazem uma regulação para cima do EGFR e estimulam a fosforilação dos mesmos substratos de tirosina cinase (Liebow *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1993). BN/GRP medeiam seus estímulos de crescimento

parcialmente através da amplificação do sistema EGFR tirosina cinase (Liebow *et al.*, 1994).

EGF e seu receptor são importantes na tumorigênese de várias neoplasias. A amplificação do EGFR é um sinal de agressividade tumoral e pior prognóstico de muitos cânceres (Budillon *et al.*,1991). Após a ligação com o ligante, o receptor sofre uma dimerização e com isso o domínio da proteína intracelular tirosina cinase torna-se ativada e o receptor se autofosforila. Posteriormente, o EGFR é internalizado e, ou é destruído nos endossomas, ou é reciclado para a superfície celular. O EGFR contribui para o crescimento do câncer de próstata andrógeno-independente, e o seu bloqueio por anticorpo monoclonal inibe o crescimento dessa neoplasia (Peng *et al.*,1996). Em muitos modelos experimentais, o tratamento com antagonistas da BN/GRP produz redução dos receptores de EGFR, concomitantes com a inibição do crescimento tumoral (Kim *et al.*,1998; Pinski *et al.*,1994; Radulovic *et al.*, 1994; Shirahige *et al.*,1994; Szepeshazi *et al.*,1992; Szepeshazi *et al.*,1993; Yano *et al.*, 1994; Pinski *et al.*,1993; Pinski *et al.*, 1993; Halmos *et al.*,1997). O envolvimento de fatores de crescimento como EGF, IGF-I e IGF-II e BN tem sido extensamente estudado em câncer de pulmão e parece que o efeito inibitório dos antagonistas da BN é mediado pela interferência com mecanismos do EGFR (Cuttitta *et al.*, 1985; Cuttitta *et al.*, Nature,1985; Moody *et al.*,1993; Damstrup *et al.*, 1992; Macaulay *et al.*, 1990; Minuto *et al.*, 1988; Reeve *et al.*,1993; Veale *et al.*, 1987).

1.3 Antagonistas da Bombesina – RC -3095

a) Generalidades

O mais potente antagonista da BN é o RC-3095 [(D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-LeuΨ(CH₂NH)Leu-NH₂] (Qin *et al.*,1994; Qin *et al.*,1994; Heimbrook *et al.*,1989; Coy *et al.*,1989; Camble *et al.*, 1989; Mahmoud *et al.*,1991; Saari *et al.*,1989; Hajri *et al.*, 1992), que pertence à família dos antagonistas pseudononapeptídeos da BN/GRP (Figura 1).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bombesina		Glu	Gln	Arg	Leu	Gly	Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Met-NH ₂
GRP	Arg-Gly-Asn-His-----													
RC-3095	≈	D-21663				D-Tpi*				----- LeuΨLeu- NH ₂					
RC-3095	≈	D-22213													

Figura 1. Estrutura do RC-3095 com sais diferentes; D-21663 – sal de trifluór-acetato; D-22213 – sal acetato. Adaptado de Radulovic *et al.*, 1991.

* Tpi = 2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-3-ácido carboxílico].

O antagonista da BN, RC-3095 foi sintetizado através de uma técnica de fase sólida da resina benzidrilamina no laboratório de Schally (Universidade de Tulane, New Orleans) (Liebow *et al.*,1994). Na posição 6, a forma D do análogo Trp 2,3,4,9 tetrahidro-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. O antagonista da bombesina foi sintetizado com dois diferentes sais: D-21663 é um sal trifluor-acetato e D-22213 é um sal acetato (Hajri *et al.*, 1992). Além da ação antineoplásica do RC-3095, que veremos a seguir, nosso grupo descreveu outras ações dessa droga tanto em nível da modulação da memória como também na sua ação efetiva contra sepse em modelos animais (Roesler *et al.*,2003; Roesler *et al.*,2004; Dal-Pizzol *et al.*, 2005).

b) Efeito Antitumoral

O RC-3095 exerce intensa atividade inibitória em uma grande variedade de neoplasias humanas, incluindo linhagem de células humanas de câncer de mama MCF-7 MIII (Yano *et al.*,1994), linhagem de câncer mamário de camundongos MXT hormônio-dependente e independente (Szepeshazi *et al.*,1992), câncer pancreático induzido por nitrosamina em *hamsters* (Szepeshazi *et al.*,1993; Szepeshazi *et al.*,1991), câncer de próstata em ratos andrógeno-independentes *Dunning* R-3327-AT-1 (Pinski *et al.*,1994), câncer de cólon HT-29 (Radulovic *et al.*, 1991), assim como linhagens de câncer prostático PC-3, PC-82 e DU145 (Jungwirth *et al.*,1997; Milovanovic *et al.*,1992; Pinski *et al.*,1994; Pinski *et al.*, 1993), câncer pancreático humano CFPAC-1 e SW-19990 (Qin *et al.*, 1994; Qin *et al.*,1995), bem como câncer gástrico humano MKN-45 e Hs746 (Qin *et al.*,1994; Pinski *et al.*, 1994) transplantados em camundongos atímicos.

Em um modelo experimental de câncer de pâncreas em *hamsters*, a administração crônica do RC-3095 causou uma queda precoce (10 dias), sustentada na expressão de EGF-R. Os níveis dos receptores retornaram aos valores basais após quatro dias de cessar a droga. Interessante também notar o efeito agudo do RC-3095 nesse experimento em relação aos receptores de EGF. Após 6 horas da administração da droga ocorreu uma queda de 67% desses receptores e essa queda manteve-se por 24 horas (Szepeshazi *et al.*, 1999).

O RC-3095 inibiu o crescimento de linhagem de células de câncer de mama humano MDA-MB-468 estrógeno-independente em xenoenxertos de camundongos atímicos que expressavam receptores de EGF e BN (Kahan *et al.*, 2000). Esses achados de atividade antitumoral do RC-3095 também foram descritos para modelos animais em câncer de ovário (Chatzistamou *et al.*, 2001). Nesse estudo, também foi mostrado um efeito sinérgico entre o antagonista da BN e o antagonista do Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante (LHRH). Posteriormente, o mesmo grupo documentou uma regressão tumoral em linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-435 estrógeno-independente e com expressão do Fator de Crescimento Epidérmico-2 (ErbB-2) (Bajo *et al.*, 2002).

Além disso, RC-3095 compete efetivamente pela ligação com a BN em células H345 de CPPC, inibe a liberação de amilase do pâncreas de ratos (Radulovic *et al.*, 1991) e diminui a progressão de lesões pré-malignas induzidas por carcinógenos (Liebow *et al.*, 1993).

Recentemente, o grupo do professor Schally demonstrou em linhagem de câncer de mama hormônio independente que o RC-3095 inibe a expressão dos níveis protéicos dos fatores angiogênicos VEGF, IGF, FGF, MMP-9 (Bajo *et al.*, 2004). Esse efeito antiangiogênico do RC-3095 também foi demonstrado em câncer renal (Heuser *et al.*, 2005).

Outras abordagens promissoras com os antagonistas da BN/GRP é a sua conjugação com drogas citotóxicas. Essa estratégia de tratamento relaciona terapia alvo com terapia citotóxica. Vários experimentos já demonstraram o efeito sinérgico dessa combinação (Szepeshazi *et al.*, 2003; Moody *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2005a; Engel *et al.*, 2005b; Engel *et al.*, 2005c; Kanashiro *et al.*, 2005; Szepeshazi *et al.*, 2005; Stangelberger *et al.*, 2006).

c) Estudos de toxicidade

No laboratório de Schally (*Toxicology Report: data on file*; Asta Laboratórios, Alemanha) foram realizados estudos com ratos *Wistar* e cães *Beagle* com vistas à obtenção de informação sobre o perfil de toxicidade do RC-3095 após administração diária repetida por via SC nesses animais. Não foi achada toxicidade sistêmica significativa nesses animais. Maiores detalhes encontram-se no Anexo VI.

vi. JUSTIFICATIVA

Apesar dos recentes avanços na área oncológica, estima-se que mais de 50% dos pacientes com tumores sólidos desenvolverão doença à distância e, conseqüentemente, irão morrer da neoplasia. Por outro lado, os atuais agentes antineoplásicos são bastante tóxicos aos pacientes e, se por um lado ajudam no combate a doença, por outro, podem provocar efeitos adversos agudos e tardios.

Com base nisso, necessitamos de novos agentes mais específicos à doença e menos tóxicos. Nesse cenário, o RC-3095, um novo antagonista da bombesina/ peptídeo liberador de gastrina, é um agente que merece estudos mais aprofundados, por aliar baixa toxicidade sistêmica em modelos animais e por ser um agente mais específico ao combate do câncer através do antagonismo da via bombesina/GRP, já amplamente documentada como participante do crescimento de inúmeros tumores humanos.

vii. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar o comportamento farmacocinético e efeitos farmacodinâmicos do RC-3095 em pacientes portadores de neoplasias avançadas refratárias ao tratamento.

2. Objetivos Específicos

- a) Desenvolver um método para determinação dos níveis de RC-3095 no plasma.
- b) Descrever os principais parâmetros farmacocinéticos do RC-3095 no plasma de pacientes incluídos neste estudo.
- c) Avaliar os principais efeitos farmacodinâmicos do RC-3095 nesta população de pacientes (toxicidade clínica, efeito antitumoral, modificações em parâmetros funcionais, tais como as concentrações de fatores de crescimento (EGF, FGF, VEGF e IGF) e níveis de gastrina sérica).
- d) Recomendar uma dose recomendável para estudos de Fase II em pacientes com tumores avançados.

PARTE 2 – Artigos Originais

Artigo número 1

Publicado no J Chromatography B, 816:321-326, 2005.

Quantificação do RC-3095, um antagonista da bombesina/peptídeo liberador de gastrina por cromatografia líquida/espectrometria de massa

Alberto S. Pereira, Luciane DiLeone, Fabiano H. Souza, Sergio Lilla, Marc Richter,
Gilberto Schwartsmann, Gilberto De Nuccia

Resumo

A BN e o seu equivalente em mamíferos, o GRP, estimulam a proliferação celular e estão envolvidos na patogênese de vários tipos de câncer humanos. Foi mostrado que a BN/GRP e seus receptores são fundamentais para o crescimento de vários tumores como o câncer pulmonar de pequenas células, próstata, ovário, estômago e mama em modelos experimentais de xenoinxertos. No presente estudo, um rápido, sensível e robusto método foi desenvolvido para determinação e quantificação do RC-3095 (D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu Ψ (CH₂NH)Leu-NH₂), no plasma humano por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa. O RC-3095 foi extraído de 0,2 ml de plasma humano por precipitação de proteína, usando acetonitrila fria (0,4ml). O método apresentou um tempo de corrida cromatográfica de 10 minutos usando uma coluna analítica C8 (150 mm x 4,6 mm d.i.) e uma curva de calibração linear que variou na faixa de 20 a 10000 ng ml⁻¹ ($r^2 > 0,994$). A precisão entre corrida, baseada no desvio-padrão relativo, que replicou os controles de qualidade, foi de 5,7% (60 ng ml⁻¹), 7,1% (600 ng ml⁻¹) e 6,8% (8000 ng ml⁻¹). A acurácia intercorrida cromatográfica para as concentrações mencionadas acima foi $\pm 0,0$, 2,1 e 3,1% respectivamente. O método desenvolvido permite a determinação quantitativa do peptídeo RC-3095 para estudos farmacocinéticos no plasma humano.

Palavras-chaves: RC-3095; Antagonista da bombesina; Peptídeo; Plasma humano; Quantificação.

1. Introdução

A BN e o seu equivalente em mamíferos, o GRP, têm uma ampla variedade de atividades neuroendócrinas [1,2], como a proliferação de vários tipos de células. A administração crônica da BN/GRP aumenta o conteúdo de DNA da mucosa gástrica e intestinal e induz hiperplasia de células da mucosa [2]. Diferentes estudos têm demonstrado que os antagonistas da BN/GRP inibem o crescimento de várias neoplasias por interferir no efeito de crescimento estimulativo dos peptídeos tipo-BN e reduzem os níveis do fator de crescimento epidérmico [3,4]. O RC-3095 pertence a uma série de antagonistas do receptor da BN/GRP sintetizados por Schally e colaboradores [5], e tem sido selecionado para desenvolvimento clínico devido à sua marcada atividade antitumoral em modelos experimentais de tumores humanos *in vivo* e pela sua baixa toxicidade sistêmica em animais [6]. Pouco é conhecido sobre a farmacocinética dos antagonistas da BN/GRP. Vários relatos mostram que a meia vida dos peptídeos tipo-BN é muito curta na circulação. Em ratos, o nível do RC-3095 declinou rapidamente após administração subcutânea de dose única e tornou-se imensurável após 3 a 5 horas [2]. O método de radioimunoensaio é freqüentemente utilizado para quantificar o RC-3095 no plasma. Contudo, essa abordagem é muito laboriosa e necessita de anticorpos seletivos contra esse peptídeo. A quantificação de diferentes drogas em matriz biológica por LC-MS-MS está se tornando comum pela sua alta sensibilidade e especificidade [7]. Atualmente, o RC-3095 está sendo testado em um estudo clínico de fase I em pacientes com neoplasias sólidas avançadas.

Considerando que o método de radioimunoensaio descrito previamente para aferição do RC-3095 mostrou-se inadequado em amostras de plasma humano [8], desenvolvemos com sucesso um método rápido, sensível e específico com LC-MS-MS para sua quantificação no plasma humano. O procedimento requereu uma simples precipitação de proteína e foi desenvolvido para estudos farmacocinéticos.

2. Experimento

2.1. Reagentes e produtos químicos

Antagonista dos receptores da BN, o RC-3095 (99% de pureza) foi obtido do Laboratório Zentaris (Frankfurt/Main, Alemanha). Acetonitrila foi comprada da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), enquanto o ácido fórmico, grau analítico foi adquirido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Foi obtida água ultrapuro de um sistema de gradiente de membrana Millipore® (São Paulo, Brasil). Amostras de sangue controles em branco foram coletadas de voluntários sadios não expostos à droga. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue tratado com anticoagulante de heparina de sódio. O *pool* de plasma foi preparado e armazenado a aproximadamente – 70 °C até ser utilizado.

2.2. Padrões de calibração e controles de qualidade

A solução do antagonista do receptor da BN, RC-3095, foi preparada em água em concentrações de 1 mg ml⁻¹. As curvas de calibração do RC-3095 foram padronizadas em plasma humano em branco nas concentrações de 20,

50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 e 10000 ng mL⁻¹ e foram realizadas em duplicata em cada lote. Amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas em plasma em branco nas concentrações de 60, 600 e 8000 ng mL⁻¹ (CQA, CQB e CQC, respectivamente).

2.3. Preparo das amostras

Alíquotas (0,20 ml) de plasma humano foram utilizadas para precipitações simples de proteína, 0,40 ml de acetonitrila fria foram adicionadas e as amostras foram misturadas por 40 segundos, centrifugadas a 3000 rpm; a camada superior foi transferida para túbulos de vidro, vedado e colocado em um equipamento amostrador.

2.4. Condições da cromatografia líquida e espectrometria de massa

Um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Modelo Hewlett-Packard 1100) consistindo de uma bomba binária (G1312A) foi utilizado para todas análises. O sistema cromatográfico apresentava uma coluna analítica da Genesis C8 (150 mm x 4,6 mm d.i, 3µm espessura do filme) e a fase móvel era composta de uma mistura de solvente A [água (0,1% de TFA)] e B [acetonitrila (0,1% de TFA)] em um gradiente como mostrado na Tabela 1. O tempo total de corrida foi de 10 minutos em uma taxa de fluxo de 1,0 ml min⁻¹. A coluna foi operada a temperatura ambiente e apresentou um tempo nulo de 1,0 minuto. A temperatura do amostrador (CTC Analytics, HTS PAL) foi mantida em 6,5 °C e foi programado para 40 µl de injeção por amostra.

Tabela 1. Condições do gradiente de fase móvel.

Tempo (min)	Fase móvel A(%) (água, 0,1% TFA)	Fase móvel B (%) (acetonitrila, 0,1% TFA)
0,0	90	10
0,1	90	10
3,0	50	50
8,5	30	70
9,5	90	10
10,0	90	10

A MS-MS foi realizada em um aparelho de triplo estágio Sciex API 4000, espectrometria de massa quádruplo (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) equipado com uma sonda de ionização química a pressão atmosférica, operando em modo positivo. A temperatura do bloco fonte foi marcada para 450°C, a voltagem capilar da sonda de ionização foi 5,5 kV e o gás de colisão usado foi o nitrogênio. A análise quantitativa foi realizada no modo de MMR, onde foi monitorada a seguinte transição: MMR m/z 553,9 \rightarrow 144,1 foi usado para detectar o antagonista da BN, RC-3095. Foi utilizado na MMR uma voltagem do cone de 31V, uma energia de colisão de 45 eV e um potencial de saída de colisão de 10V. Os dados foram analisados pelo *Analyst Software* (Applied Biosystems 1.3.1) e as curvas de calibração para a análise foram construídas usando a área do pico referente ao peso do RC-3095 através de método adaptado de regressão linear ($1/x^2$). As áreas de picos das amostras foram interpoladas na curva de calibração para obtenção das concentrações do RC-3095.

2.5. Recuperação

Experimentos preliminares foram conduzidos para avaliar a recuperação com os métodos de extração descritos acima. A percentagem de recuperação foi calculada através da razão da área de pico do plasma em branco extraído em cada concentração padrão (60, 600 e 8000 ng ml⁻¹) relativo à área de pico das amostras de plasma em branco equivalentes após a extração.

2.6. Avaliação da supressão iônica

Para verificar o efeito da supressão iônica no sinal da MS-MS do analítico, RC-3095, o procedimento de extração descrito acima foi avaliado. A montagem experimental consistiu de uma bomba de infusão conectada ao sistema por uma baliza de volume zero antes da separação e o sistema de bomba de HPLC bombeando a fase móvel que foi a mesma usada na rotina da análise do RC-3095. A bomba de infusão foi programada para transferir (10 µl/min) do analítico em água (10 µg/ml).

2.7. Estabilidade

Amostras de CQ preparadas para testar estabilidade (60, 600 e 8000 ng ml⁻¹) foram submetidas a 6 horas em temperatura ambiente, 3 ciclos de congelamento-descongelamento e testes de estabilidade em um amostrador (8

°C) em 24 horas. Subseqüentemente, as concentrações do peptídeo RC-3095 foram medidas em comparação com amostras preparadas a fresco.

2.8. Precisão e acurácia

A precisão intra e intercorrida foram determinadas com desvio-padrão relativo, DPR (%) = $100 (DP/M)$ e a acurácia como a percentagem de erro relativo, ER (%) = $(E-T) (100/T)$, onde M é a média, DP é o desvio-padrão da média, E é a concentração experimental determinada e T é a concentração teórica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Desenvolvimento do método

A MS-MS, operando em modo positivo para o antagonista do receptor da BN RC-3095, mostrou uma base de pico iônica m/z 144, outra intensidade iônica foi de m/z 553,9 [(com intensidade relativa de 55%)], íon molecular com dois H⁺] (Figura 1A). A transição m/z 553,9 – 144,1 foi a mais intensa transição observada no espectro MS-MS (Figura 1B). O íon m/z 144,1 é produzido pela fragmentação do grupo Tpi (2,3,4,9- tetrahydro-1H-pirido[3,4-b]indol-3-ácido carboxil) (Figura 2). Através da alta intensidade da reação m/z 553,9 – 144,1 e

da não detecção de interferência das amostras de plasma em branco, essa transição foi usada no presente método.

O limite de quantificação (LQ) foi validado para 20 ng ml⁻¹ e com um tempo de corrida de menos de 10 minutos. O cromatograma de massa das amostras em branco e o LQ são mostrados na Figura 3, na qual o tempo de retenção do RC-3095 foi de 4,9 minutos. Nenhum padrão interno foi usado porque o preparo das amostras necessita somente de um passo de precipitação protéica.

Nesse sistema, não foi observada supressão iônica do sinal da MS-MS no tempo de eluição (Figura 3C).

3.2 Desempenho do ensaio

O método otimizado foi validado pela avaliação da recuperação, linearidade, LQ, precisão e acurácia. Coeficientes de variação e erros relativos de menos de 15% foram considerados aceitáveis, exceto para a quantificação do LQ, onde os valores usados foram de 20%, como recomendado por Shah et al [9] e Bressole et al. [10] para amostras de análise biológica para estudos farmacocinéticos. O método foi linear na faixa de concentração de 20 a 10.000 ng/ml⁻¹ ($r^2 > 0,9970$) para as curvas repetidas, dados da CC média (n=3) estão

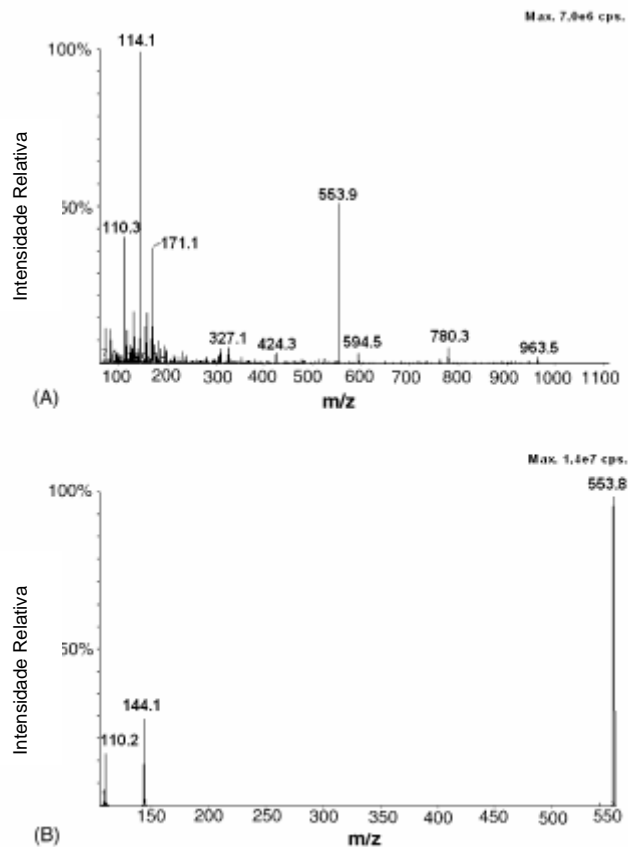


Fig.1. Espectro de massa de todo peptídeo RC-3095 (A) e seus respectivos espectros de produtos iônicos (B).

mostrados na tabela2.

A recuperação do RC-3095, calculado das proporções das áreas de pico do plasma humano extraídos, com picos de elevações de concentrações finais de 60, 600 e 8000 ng ml⁻¹ ($n=15$ para cada concentração) foi 72,8 , 89,7 e 87,4%, respectivamente.

D-Trp-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂NH)Leu-NH₂

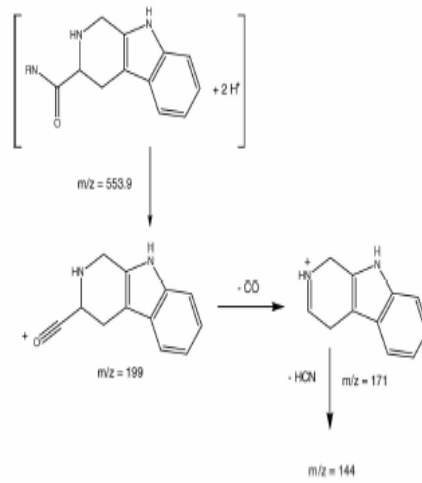
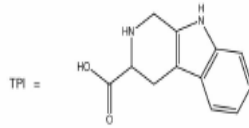
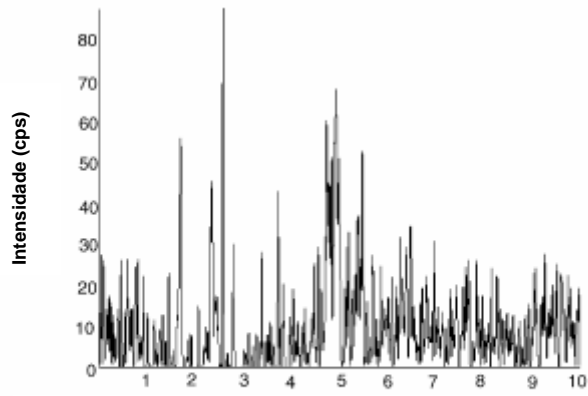
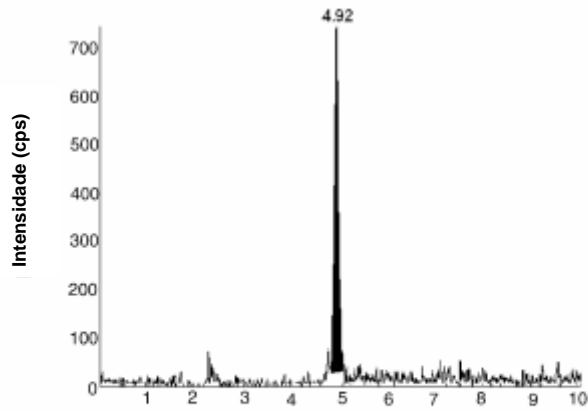


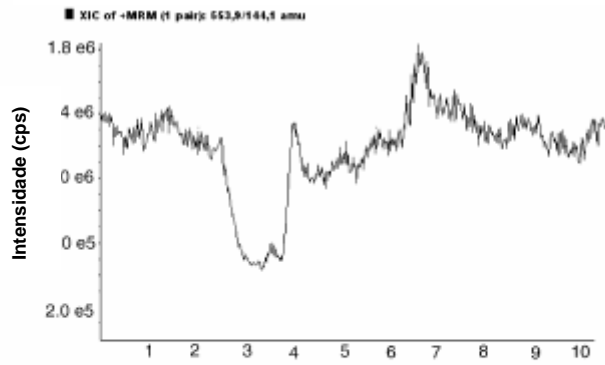
Figura 2. Proposta das vias de fragmentação de massa do peptídeo RC-3095.



(A) Tempo (min)



(B) Tempo (min)



(C) Tempo (min)

Fig.3. Cromatograma das MMR do RC-3095 (A) do plasma humano branco, (B) do pico do peptídeo RC-3095 no plasma humano na concentração final de 20 ng ml⁻¹ e (C) teste de supressão iônica para o RC-3095 (infusão 10 µl ml⁻¹ de solução de RC-3095 em 1 µg ml⁻¹ de água).

Tabela 2
Curva de calibração da validação dos dados para o RC-3095

Valor esperado (ng/ml)	Resultados curva validação			Média	Acurácia (%)	CV(%)
	Concentração (ng/ml)					
	C1	C2	C3			
20	18,9	19,1	20,2	19,4	97	3,6
	18,9	18,2	17,5	18,2	91	3,8
50	52,4	54	57,6	54,7	109,3	4,9
	56,9	57,6	50,9	55,1	110,3	6,7
100	109	107	106	107	107,3	1,4
	109	112	117	113	112,7	3,6
200	104	198	190	164	82	31,8
	105	206	207	173	86,3	33,9
500	484	514	504	501	100,1	3,1
	491	530	537	519	103,9	4,8
1000	1050	988	1060	1030	103,3	3,8
	1060	1010	1040	1040	103,7	2,4
2000	959	1960	1750	1560	77,8	33,9
	1010	2010	1910	1640	82,2	33,5
5000	4620	4700	4850	4720	94,5	2,5
	4770	4730	4830	4780	95,5	1,1
10000	9470	8630	8840	8980	89,8	4,9
	8520	8730	9040	8760	87,6	3,0
Coeficiente de correlação	0,9951	0,9990	0,9989			

A acurácia e a precisão intra e intercorrida para os controles de qualidade são mostrados na Tabela 3. Para detectar interferências em diferentes amostras plasmáticas, o plasma em branco de 100 voluntários sadios foi analisado e, em todos os casos, nenhum pico maior que 1/6 do pico do LQ

Tabela 3

Validação com controles de qualidade (CQ) contendo os resultados de acurácia e precisão do RC3095

Parâmetro	Concentração nominal (ng ml ⁻¹)			
	20	60	600	8000
Intralote				
Média (n=8) (ng ml ⁻¹)	21,6	66,3	537	7585
Acurácia (%)	7,7	2,5	1,6	2,2
Precisão (%)	108	110,5	89,5	94,8
Interlote				
Média (n=3) (ng ml ⁻¹)	21,1	67,5	585	7603
Acurácia (%)	3,8	1,4	5,8	3,5
Precisão (%)	105,5	112,5	97,5	95,0

foi observado. O resultado dessa análise foi usado para calcular o limite de decisão [11] do presente método ($CC\alpha$, média da resposta obtida das amostras do plasma dos 100 voluntários mais 2,33 DP) foi de 3,6 ng ml⁻¹. O método oferece a vantagem sobre os métodos previamente relatados, tendo um simples método de extração e um rápido tempo de corrida (10 minutos).

BN/GRP e seus receptores são importantes no crescimento de vários tumores humanos, como o de CPPC, próstata, estômago, ovário e mama em modelos de xenoenxertos de tumores humanos [12,13]. Essa via de estimulação autócrina tem um efeito direto na proliferação de células tumorais e pode ser inibido por um antagonista específico da BN/GRP [14]. Notadamente, o RC-3095 não tem qualquer toxicidade significativa em camundongos, nas doses que causam regressão tumoral.

Por essa razão, o RC-3095 foi selecionado como o primeiro da série de antagonistas sintéticos da BN/GRP para entrar em estudos clínicos de

humanos. Até o momento, trinta pacientes com vários tipos de neoplasias avançadas refratárias receberam o RC-3095 como parte de um estudo clínico e farmacocinético de fase I, no qual a droga foi administrada aos pacientes por doses diárias de injeções subcutâneas (8 a 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Evidências de atividade tumoral foram documentadas em pacientes com câncer de próstata refratário a hormônio e em uma paciente com carcinoma medular de tireóide. O plasma foi obtido de pacientes incluídos nesse estudo de fase I, imediatamente antes e após a administração do RC-3095 em vários tempos; resultados preliminares de dois pacientes são mostrados na Figura 4.

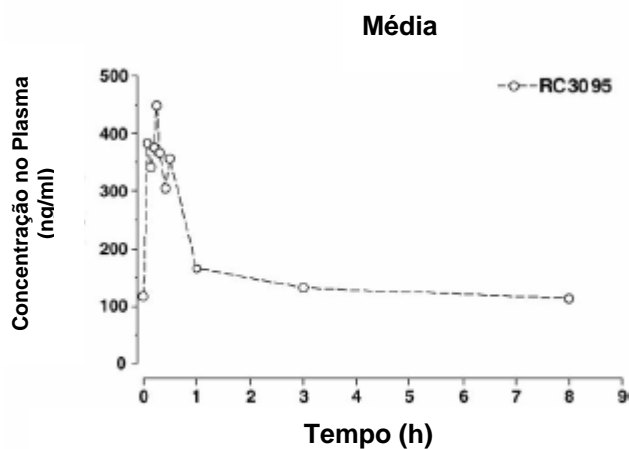


Fig.4. Média dos níveis plasmáticos do RC-3095 seguido da administração subcutânea de dois pacientes com câncer (8-96 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

4. Conclusões

O método de LC-MS-MS para quantificação do peptídeo RC-3095 no plasma humano foi desenvolvido e validado. Esse método oferece a vantagem sobre os métodos reportados anteriormente, em relação a um simples processo de extração (precipitação protéica sem procedimentos de limpeza) e a um rápido tempo de execução (10 minutos). O LQ de 20 ng ml^{-1} é suficiente para estudos farmacocinéticos (LQ estimado/ C_{max} < 3%) e pode ser melhorado pela concentração da amostra, se requerido. Os resultados do desempenho do ensaio indicam que o método é suficientemente preciso e acurado para determinação de rotina do peptídeo RC-3095 no plasma humano.

Referências

- [1] F. Thomas, C. Mormont, B. Morgan, *Drugs Future* 19 (1994) 349.
- [2] K. Szepeshazi, A.V.Schally, G. Halmos, N. Lamharzi, K. Groot, J.E. Horvath, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 10913.
- [3] A.V. Schally, A.M. Comaru-Schally, A.Nagry, M.Kovacs, K. Szepeshazi, A.Plonowski, J.L.Varga, G.Halmos, *G. Front, Neuroendocrinol* 22(2001) 248.
- [4] A.M. Bajo, A.V. Schally, K. Groot, K. Szepeshazi, *Br.J.Cancer* 90 (2004) 245.
- [5] Y. Qin, T.Ertl, R.Z.Cai, G.Halmos, A.V. Schally, *Cancer Res.* 54 (1994) 1035.
- [6] J. Pinski, A.V. Schally, G. Halmos, K.Szepeshazi, K.Groot, *Cancer Res* 54 (1994) 5895.
- [7] R. Kostianien, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, *J. Mass Spectrom* 38 (2003) 357.
- [8] K. Groot, J.E. Horvath, R.Z. Cai, A.V. Schally, *Int J. Pept. Protein Res* 45 (1995) 561.
- [9] V.P. Shah, K.K. Midha, S.Dighe, I.J. McGilvery, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layoff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pitman, S. Spector. *Pharm.Res.* 9 (1992) 588.
- [10] F. Bressolle, M.B.Petit, M.Audran, *J.Chromatogr. B* 686 (1996) 3.
- [11] COMMISSION DECISION (EC) 2002/657, *Off.J.Europ.Communities* L221 (2002) 8.
- [12] A.M. Bajo, A.V. Schally, M.Krupa, F.Herbert, K. Groot, K.Szepeshazi, *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 99 (2002) 3836.
- [13] H. Reile, P.E. Armatis, A.V. Schally, *Prostate* 25 (1994) 29.
- [14] G. Halmos, J.Pinski, B.Szoke, A.V. Schally, *Cancer Lett* 85 (1994) 111.

Artigo 2

Aceito para publicação no Investigational New Drugs em setembro de 2006

Invest New Drugs 24:403-12, 2006

Estudo fase I do antagonista do peptídeo liberador de gastrina/bombesina (BN/GRP) RC-3095 em pacientes com tumores sólidos avançados

G. Schwartzmann, L. P. DiLeone, M. Horowitz, D. Schunemann, A. Cancelli, A. S. Pereira, M. Richter, F. Souza, A. Brondani da Rocha, F. H. Souza, P. Pohlmann, G. De Nucci

Resumo

A BN/GRP ligam-se a receptores específicos de membrana celular e funcionam estimulando o crescimento de vários modelos de tumores murinos e humanos. O RC-3095, um novo antagonista sintético da BN/GRP, é capaz de produzir longas remissões tumorais em vários modelos animais e humanos *in vitro* e *in vivo*. Estudos de toxicidade animal não detectaram toxicidade de órgãos, exceto irritação local no sítio da injeção. A proposta deste estudo é determinar a segurança e a viabilidade da administração do RC-3095 por via subcutânea, uma vez ao dia, em pacientes com tumores sólidos avançados e refratários. Vinte e cinco pacientes receberam RC-3095 diariamente em doses que variaram de 8 a 96 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), uma a duas vezes ao dia. As doses foram escalonadas em grupos de 3 a 5 pacientes por nível de dose. A única toxicidade observada foi desconforto no sítio da injeção nos níveis mais elevados de dose. Uma dose única do RC-3095, no nível mais alto de dose (96 $\mu\text{g}/\text{kg}$), produziu uma diminuição dos níveis basais de gastrina plasmática de 50% em um paciente hipergastrinêmico com a síndrome de Zollinger-Ellison 6 horas após a administração. Nenhuma resposta tumoral objetiva foi documentada. Uma resposta menor de curta duração foi observada em uma paciente com carcinoma medular da tireóide que apresentava uma alta expressão de GRPR no tumor. Por causa de problemas com método analítico, dados de farmacocinética plasmática foram obtidos somente de dois pacientes no maior nível de dose. Nesses pacientes, o RC-3095 alcançou concentrações plasmáticas $> 100 \text{ ng/ml}$ em cerca de 8 horas, as quais estão dentro dos níveis terapêuticos com base em dados prévios em camundongos e ratos. A meia vida de eliminação plasmática ficou entre 8,6 a 10,9 horas. Por causa da toxicidade local no sítio da injeção, o procedimento de escalonamento de dose não pode ser completamente avaliado até a dose máxima tolerada. Assim, a dose recomendada para estudo de fase II não pode ser claramente estabelecida. Considerando seu novo mecanismo de ação e sua impressionante atividade antitumoral pré-clínica, outros estudos, na busca de novas formulações da droga para uso em humanos, como preparações de liberação lenta e análogos com farmacocinética mais favorável, devem ser explorados.

Palavras-chaves: Antagonista da bombesina/GRP - RC-3095 - Estudos de fase I – Tumores sólidos

Introdução

A bombesina (BN) é um peptídeo de 14 aminoácidos que foi isolado da pele de sapo [1]. Estudos usando anticorpos da BN de anfíbios revelaram a presença de imunorreatividade tipo-BN no sistema nervoso central (SNC) e trato gastrintestinal (TGI) em mamíferos [1]. Peptídeos tipo-BN também foram caracterizados, incluindo o peptídeo liberador de gastrina (GRP) e a neuromedina-B (NMB). Posteriormente, três receptores de mamíferos tipo-BN foram clonados: receptor GRP/BN preferencial, receptor de NMB e receptor órfão subtipo 3. Esses receptores transmembrana são acoplados à proteína G e são capazes de estimular várias vias de sinalizações intracelulares [1].

BN/GRP mostraram-se envolvidos em várias vias neuroendócrinas. BN e GRP estimulam a secreção de gastrina, somatostatina e suco pancreático. Os peptídeos tipo-BN estimulam a contração do músculo liso na bexiga urinária, útero, vesícula biliar e estômago. Os receptores de superfície celular para BN/GRP também foram descritos em elementos neuronais nos plexos entérico e no SNC, bem como na proliferação celular em uma variedade de modelos experimentais como os fibroblastos de *Swiss 3T3*, células pulmonares fetais, células digestivas e pancreáticas [1].

Os receptores de BN/GRP também têm papel no desenvolvimento e progressão de tumores murinos e humanos [2-4]. Os receptores de GRP foram descritos em linhagens de CPPC e observou-se que o GRP faz um estímulo autócrino para o crescimento desses tumores [2-5]. O envolvimento da BN/GRP

no crescimento de outros tumores, como o gástrico, pancreático, intestinal, mamário e o prostático também foram descritos [6-8].

Com base na observação do efeito estimulatório do crescimento de vários tumores em modelos pré-clínicos dos peptídeos tipo-BN, uma série de antagonistas foram sintetizados e testados em sistemas tumorais experimentais [9,10]. O pseudonapeptídeo antagonista dos receptores da BN/GRP [D-Tpi⁶,Leu¹³,psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] (RC-3095) e outros antagonistas mostraram possuir efeito inibitório no crescimento de câncer mamário MTX de camundongos, no câncer prostático de ratos *Dunning* e em câncer pancreático induzido por nitrosaminas em *hamsters*, assim como em tumores humanos como as linhagens SW-1990 pancreática, MCF-7MIII mamária, MKN-45 gástrico, HT-29 intestinal, PC-3 prostático e vários CPPC implantados em camundongos atímicos [11-15]. Nos experimentos acima *in vivo*, o RC-3095 foi administrado através de bombas osmóticas (liberação de 20 a 60 µg/dia) ou via injeção subcutânea (na dose de 20 µg uma vez ao dia) [16-18].

Nos estudos farmacocinéticos em camundongos, o pico plasmático do RC-3095 foi em 2 minutos após injeção intravenosa da droga (7,7 µg /ml). Em 1 hora, os níveis caíram para 41 ng/ml e continuaram decrescendo. Após administração subcutânea, o pico plasmático ocorreu em 15 minutos (271 ng/ml) e caiu para 10 ng/ml em 3 horas, tornando-se não detectável em 5 horas. Com a meia vida plasmática muito curta em ratos e camundongos, atingindo níveis não mensuráveis em 3 horas, a manutenção do efeito inibitório de

crescimento tumoral estável parece ser dependente da ativação do RC-3095 de outras vias de crescimento como a do EGFR [19].

Notavelmente, o 2A11, um anticorpo monoclonal murino anti-BN, foi capaz de inibir o crescimento tumoral em linhagens celulares de carcinoma de pequenas células humanas produzindo um efeito antitumoral [9]. Por questões logísticas, esse anticorpo não foi mais estudado. Desde então, vários antagonistas sintéticos foram desenvolvidos como potenciais agentes experimentais anticancerígeno [10,11].

O RC-3095 é um antagonista seletivo da BN/GRP [6-14] sintetizado por Schally e colaboradores [12], que demonstrou produzir significativas regressões tumorais em vários modelos experimentais, incluindo CPPC, pâncreas, próstata, ovário, estômago em linhagens celulares implantadas em camundongos atímicos [13,14]. A administração subcutânea do RC-3095 em doses diárias entre 10-20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ foi associado à marcada regressão tumoral, incluindo respostas completas, sem efeitos tóxicos significativos [15,16].

Foi também mostrado que o RC-3095 inibe o crescimento de células de câncer de mama humano por interferir nos efeitos estimulatório dos peptídeos tipo-BN, reduzindo a expressão do RNAm e dos níveis de proteínas do ErbB-2 [17]. Além disso, a inibição do crescimento tumoral pelo RC-3095 foi associada com a redução do volume do tumor vascular e dos níveis protéicos de VEGF-A, bFGF e IGF-II [18,19].

A toxicologia animal foi realizada em ratos *Wistar* e cães *Beagle*, usando injeções diárias de RC-3095 por via subcutânea em solução de água e manitol. Em ratos, grupos de animais foram expostos ao RC-3095 por 4 semanas consecutivas em doses que variaram de 3 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sem efeito tóxico detectado. Estudos realizados em cães, usando RC-3095 por 2 semanas consecutivas nos mesmos níveis de dose, confirmaram a falta de efeitos tóxicos desse componente. O único efeito adverso atribuído ao RC-3095 foi a dor e eritema no local da injeção nos níveis de dose mais altos. De fato, por causa da sua baixa solubilidade em crescentes doses e as limitações do volume da injeção, a determinação da dose tóxica e letal em animais não foi atingida, não sendo possível assim a definição de uma dose para estudos clínicos no homem.

Considerando o seu novo mecanismo de ação, a falta de efeitos tóxicos e a marcada atividade antitumoral em modelos animais, decidimos iniciar um estudo de fase I com parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do RC-3095 em pacientes com tumores sólidos avançados e refratários. A dose inicial do RC-3095 foi de 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ administrada por via subcutânea uma vez ao dia, que derivou do nível de dose seguro e com atividade antitumoral nos camundongos. Considerando que a GRP mostra quase 100% de homologia com a BN nos 10 resíduos C-terminal (Figura 1), tentamos usar os efeitos da administração do RC-3095 com os níveis de gastrina plasmática como marcador de resposta biológica. Os níveis plasmáticos de EGF, VEGF, IGF e FGF foram medidos no

plasma e em tecido cutâneo normal de alguns pacientes, enquanto os receptores de GRP foram estudados em amostras tumorais selecionadas.

Peptídeos Relacionados a Bombesina Conhecidos

Bombesina	p-EQRL	GNQWAVGHLM-NH ₂
GRP Humano	VPLPAGGGTVLTKMYPR	GNHWAVGHLM-NH ₂
NMB Humano	APLSWDLPEPRSRASKIRVHSR	GNLWATGHFM-NH ₂
NMC-10 Humano		GNHWAVGHLM-NH ₂

Figura 1. Estrutura da BN, e dos BNPs, GRP, NMB e NMC. M-NH₂ é metionina C-terminal amidada e p-E é a abreviação para piroglutamato. A parte C-terminal da BN e dos BNPs com homologia está dentro da caixa.

Pacientes e métodos

O estudo foi conduzido pela *South-American Office for Anticancer Drug Development* (SOAD), Porto Alegre, Brasil. O fornecimento da droga foi um fator limitante para a continuidade desse estudo, causando sua interrupção temporária. Todos os pacientes incluídos nesse estudo assinaram o termo de consentimento informado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo conduzido de acordo com os

princípios das Boas Práticas Clínicas. O protocolo também foi aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Característica dos pacientes

Pacientes elegíveis para esse estudo foram adultos entre 18 e 75 anos com diagnóstico histopatológico confirmado de uma neoplasia sólida avançada e em progressão, e não elegíveis a uma modalidade terapêutica existente. Pacientes deveriam estar com estado de desempenho clínico entre 0 e 3 pela OMS, e não apresentar infecção ou outra doença em atividade; possuir uma adequada função hepática, renal e cardíaca e ter uma expectativa de vida de pelo menos 3 meses. Eles deveriam ter um intervalo livre de tratamento quimioterápico prévio de no mínimo 3 semanas (6 semanas para mitomicina C e nitrosuréia) e 4 semanas para terapia de irradiação. Aqueles com metástases em SNC, gestantes ou mulheres em amamentação não foram elegíveis para esse estudo. Similarmente, candidatos com outras neoplasias no passado, exceto câncer de pele basocelular e câncer de colo útero *in situ* também foram excluídos do estudo.

Avaliação dos pacientes

A avaliação pré-tratamento incluiu uma história médica e exame físico completos, avaliação hematológica e bioquímica, análise urinária, Raio-X de tórax e/ou Tomografia para avaliação bi-dimensional do tumor (sempre que

possível). As contagens sanguíneas e a bioquímica foram medidas semanalmente durante o tratamento. A toxicidade era avaliada semanalmente e registrada após cada ciclo (21 dias) de acordo com os critérios de toxicidade do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. A avaliação de resposta tumoral foi baseada nos critérios padrões da OMS (Anexo I).

Antes de cada ciclo de tratamento, as dimensões das lesões tumorais eram determinadas e uma contagem completa de sangue e bioquímica eram obtidas. Resposta tumoral era avaliada após cada ciclo pelas medidas dos dois maiores diâmetros. A resposta completa foi definida como desaparecimento completo de todas as lesões por pelo menos quatro semanas. Resposta parcial foi definida como a redução de pelo menos 50% do produto dos diâmetros perpendiculares das lesões por pelo menos 4 semanas. Doença sem progressão, por pelo menos quatro semanas, foi denominada de doença estável. Um aumento de pelo menos 25% dos produtos dos diâmetros perpendiculares foi classificado como progressão de doença.

Administração da droga

O RC-3095 foi manufaturado pela Zentaris AG (Frankfurt/Main, Alemanha) em forma de sal acetato. O pó foi reconstituído em 4 ml de água esterilizada a uma concentração final de 2.0 mg/ml. O volume máximo de injeção foi de 3 ml. Os farmacêuticos forneciam a exata dose de RC-3095 aos pacientes. Antes da primeira administração, o paciente era instruído pela enfermeira da pesquisa a manter a solução refrigerada até a administração e a

injetar o RC-3095 no SC de acordo com o protocolo. A enfermeira também instruía o paciente a realizar rotações do sítio de injeção e verificava a presença de reações de pele nos sítios de aplicação semanalmente.

Escalonamento de dose

A dose inicial do RC-3095 foi de 8 µg/kg, administrada uma vez ao dia por 21 dias em 3 pacientes consecutivos, no primeiro nível de dose, tendo, pelo menos, uma semana de intervalo para o início da droga entre os pacientes. No caso, como não foi observada nenhuma toxicidade, os pacientes foram mantidos nesse nível de dose até progressão da doença. A dose do RC-3095 foi então escalonada de acordo com o esquema de Fibonacci modificado em grupos de 3 a 5 pacientes e assim sucessivamente, até um nível de dose que pudesse ser recomendado para estudos posteriores. Não foi permitido escalonar dose intrapacientes. Os níveis de gastrina plasmática foram medidos a cada nível de dose do RC-3095 como um potencial marcador da atividade biológica da droga e para guiar na definição de uma dose adequada para estudos posteriores. Similarmente, biópsias de pele foram analisada em alguns pacientes antes e após o início do RC-3095 para estudo dos seus efeitos na expressão de vários fatores de crescimento cutâneos.

Estudo farmacocinético e condições de cromatografia líquida e espectrometria de massa

Inicialmente, as tentativas de detectar o RC-3095 do plasma, em nosso estudo, não obtiveram sucesso por problemas com métodos analíticos disponíveis. Mais tarde, foi desenvolvido um método com LC-MS/MS [20]. O RC-3095 foi extraído de 0,2 ml de plasma humano por precipitação de proteína usando acetonitrila fria (0,4ml). O método tem um tempo de leitura cromatográfica de 10 minutos, usando uma coluna analítica C8 (150 mm x 4,6mm d.i.) e uma curva de calibração linear de variação 20 a 10.000 ng mL⁻¹ ($r^2 > 0,994$). A precisão da leitura com base nos desvios padrões relativos dos controles de qualidade foi de 5,7% (60ng mL⁻¹), 7,1% (600 ng mL⁻¹) e 6,8% (8000 ng mL⁻¹). A acurácia entre as leituras foi \pm 0.0, 2.1 e 3.1% para as concentrações mencionadas acima respectivamente.

Para medida da concentração do RC-3095 no plasma, foi coletado sangue imediatamente antes e em vários tempos (zero, 4, 8, 12, 16, 20, 30, 45 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 horas), após a administração da primeira dose da droga em apenas 2 pacientes do nível mais alto de dose. Cada amostra foi imediatamente centrifugada por 10 minutos na velocidade de 3000 rpm e o plasma foi armazenado em alíquotas de 2ml. Um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Hewlett-Packard, Model 1100) com uma bomba binária (G1312A) foi utilizado para todas análises. O sistema cromatográfico consistiu de uma coluna analítica Genesis C8 (150 mm x 4,6mm i.d., 3 μ m espessura de filme) e a fase móvel foi composta por uma

mistura do solvente A [água (0,1% de TFA)] e B [acetonitrila (0,1% de TFA)]. O método tem um tempo de leitura cromatográfica de 10 minutos a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} . A coluna foi operada à temperatura ambiente e apresentou um tempo nulo de 1 minuto. A temperatura do amostrador (CTC Analytics, HTS PAL) foi mantida em $6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foi programado para injetar amostras de $40\mu\text{L}$.

A MS-MS foi realizada em um espectrômetro de massas Sciex API 4000, quadrupolo de estágio triplo (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipado com sonda de ionização química a pressão atmosférica, operando em modo positivo. A temperatura do bloco fonte foi marcada para 450°C , a voltagem capilar da sonda de ionização foi $5,5\text{ kV}$ e o gás de colisão usado foi o nitrogênio. A análise quantitativa foi realizada no modo de MMR, onde foi monitorada a seguinte transição: MMR $m/z\ 553.9 \rightarrow 144.1$ usado para detectar o antagonista da BN, RC-3095. Foi utilizado na MMR uma voltagem do cone de 31V , uma energia de colisão de 45 eV e um potencial de saída de colisão de 10V . Os dados foram analisados pelo *Analyst Software* (Applied Biosystems 1.3.1) e as curvas de calibração para a análise foram construídas usando a área do pico referente ao peso do RC-3095 através de método adaptado de regressão linear ($1/x^2$). As áreas de picos das amostras foram interpoladas na curva de calibração para obtenção das concentrações do RC-3095.

Medidas dos níveis de gastrina no plasma

Os níveis de gastrina plasmática foram medidos antes da administração do RC-3095 e, em vários tempos, após a injeção da droga. As amostras foram analisadas por método de radioimunoensaio padrão, usando um produto comercial da Diasorin, MN, EUA comprado da Genese (São Paulo, Brasil).

Técnica imuno-histoquímica

Foram cortadas secções de 5µm de espessura e montadas em lâminas silanizadas e secas a 37 °C à noite. As secções foram desparafinadas em xileno, reidratadas em álcool graduado e lavada em água destilada. Após as secções, foram tratadas para recuperação de antígenos, usando citrato (10mM, pH 6.0) por 20 minutos em temperatura de fervura, seguido de 20 minutos de queda de temperaturas em tampão de citrato em temperatura ambiente. A atividade de peroxidase endógena foi eliminada pela incubação da solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Após lavar em PBS, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em blocos protéicos livres de soro (Dako, Carpinteria, CA, USA).

As lâminas foram novamente lavadas em PBS, os respectivos anticorpos primários (EGFR, VGFR, Ki67, GRP) (Dako, Carpinteria, CA, USA) foram aplicados e os tecidos foram incubados por 30 minutos a 37° C e, durante à noite, a 4°C em uma câmara de umidade. Após lavagem novamente com PBS, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Dako) por 30 minutos.

Posteriormente, nova lavagem com PBS e incubação com estreptavidina conjugada a peróxido de hidrogênio (Dako) por 30 minutos e lavado novamente em tampão de PBS. As lâminas incubadas com diaminobenzedina (Merk, WS, NJ, USA) identificaram os anticorpos ligados. Após uma lavagem final com PBS e água destilada, as lâminas foram coradas com hematoxilina, desidratadas em álcool graduado, diafanizadas em xileno e montadas.

Resultados

Foram incluídos 25 pacientes no estudo, sendo 13 homens e 12 mulheres. A idade média dos pacientes foi de 59 anos (variação de 32 a 80 anos), com um desempenho clínico na escala de ECOG de 1 (0 a 2). Os seguintes tumores foram incluídos: próstata (6), mama (3), rim (3), sarcoma de partes moles (2), CPPC (2), cólon/reto (2), pâncreas (2) e outros (5). Tratamentos prévios incluíram cirurgia (12), quimioterapia (16), radioterapia (6), terapia hormonal (4) e imunoterapia (1). A média do número de ciclos foi três (1-5). Estas características estão resumidas na tabela 1.

A dose do RC-3095 foi escalonada em diferentes grupos de pacientes como mostra a tabela 2. A dose inicial foi de 8 μ g/kg administrada por via subcutânea uma vez ao dia. Esse nível de dose foi aplicado a três pacientes, que receberam em média 4 ciclos (2-5) cada. Não foi detectada toxicidade nesse grupo de pacientes e a dose foi escalonada em 100% para 16 μ g/kg em 3 pacientes, que receberam uma média de 2 ciclos (1-3). Também nenhuma

toxicidade foi observada nesse nível de dose. Por este motivo, a dose foi novamente escalonada em 100% para 32 µg/kg uma vez ao dia nos próximos três pacientes, e a média de um (1-3) ciclo foi administrada a esse grupo. Mais uma vez, nenhuma toxicidade foi documentada.

Nessa época, dados de Schally e colaboradores sugeriram que a administração de duas vezes ao dia poderia produzir mais pronunciada regulação para baixo dos receptores de EGF em tumores de camundongos (Schally A.V., informação pessoal). Por essa razão, decidimos solicitar uma emenda do protocolo para estudar a tolerabilidade da administração do RC-3095 duas vezes ao dia via SC. Dessa forma, um grupo de três pacientes foi estudado a um nível de dose de 32 µg/kg duas vezes ao dia. Estes receberam um ciclo do RC-3095 cada e não foi observada nenhuma toxicidade sistêmica. Todavia, foi documentado desconforto local no sítio da injeção em um paciente.

A dose foi então escalonada para 48µg/kg duas vezes ao dia em outros três pacientes, que receberam uma média de 3 ciclos (1-6), com leve desconforto local em 2 dos 3 pacientes. Um outro escalonamento de dose foi realizado em 2 pacientes com 96µg/kg duas vezes ao dia, e a média de 1 ciclo foi administrado (1,2). Novamente, nenhuma toxicidade sistêmica foi observada nesses dois últimos níveis de dose. Todavia, desconforto moderado nos sítios de injeção foi documentado em ambos, interrompendo o uso da droga. Considerando a necessidade da administração SC diária do RC-3095, o uso duas vezes ao dia foi considerado inapropriado para futuros estudos, com toxicidade local sendo, portanto, considerada dose-limitante.

Foi então decidido incluir um grupo adicional de pacientes num nível de dose de 96 µg/kg uma vez ao dia. Sete pacientes receberam uma média de 2 ciclos (2-3) do RC-3095. Nenhuma toxicidade sistêmica foi observada novamente; três pacientes apresentaram toxicidade local leve nos sítios de injeção. Esse nível de dose (96 µg/kg uma vez ao dia) foi considerado adequado para ser recomendado em futuros estudo de fase II, embora aperfeiçoamento na formulação da droga seja desejável. Na tabela 3, a toxicidade clínica do RC-3095 é apresentada, incluindo todos os níveis de dose.

Embora não tenha sido documentada nenhuma atividade antitumoral nos pacientes incluídos no estudo nos níveis de dose mencionados, uma redução de quase 30% dos produtos de dois diâmetros perpendiculares de uma massa supraclavicular foi observada em uma paciente com carcinoma medular de tireóide refratário no nível III de dose (32 µg/kg, uma vez ao dia). Notadamente, essa paciente vinha sofrendo de uma diarreia secretora severa por 3 meses e obteve uma dramática melhora dos sintomas gastrintestinais. Houve também queda dos níveis de calcitonina transitoriamente. Essa resposta durou 8 semanas e então a doença progrediu e a paciente faleceu.

Características	Número de Pacientes	Percentual (%)
Sexo		
Masculino	13	(52)
Feminino	12	(48)
Idade, anos		
Média	59	
Variação	32-80	
Performance clínico (ECOG)		
Média	1	
Variação	0-2	
Tipo Tumor		
Próstata	6	(24)
Mama	3	(12)
Rim	3	(12)
Sarcoma Partes Moles	2	(8)
CPPC	2	(8)
Cólon/reto	2	(8)
Pâncreas	2	(8)
CPNPC	1	(4)
Tireóide	1	(4)
Esôfago	1	(4)
Estômago	1	(4)
Ovário	1	(4)
Terapia Prévia		
Cirurgia	12	(48)
Radioterapia	6	(24)
Quimioterapia	16	(64)
Hormonioterapia	4	(16)
Imunoterapia	1	(4)
Média de ciclos/ Pacientes	3 (1-5)	

Tabela 1. Características dos pacientes incluídos no Estudo de Fase I do RC-3095

Nível de Dose	RC-3095 * ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Número de Pacientes
I	8 uma vez ao dia	3
II	16 uma vez ao dia	3
III	32 uma vez ao dia	3
IV	32 duas vezes ao dia	3
V	48 duas vezes ao dia	3
VI	96 duas vezes ao dia	3
VII	96 uma vez ao dia	7

Tabela 2. Esquema de escalonamento de dose aplicado no Estudo de Fase I do RC-3095

* RC-3095 foi administrado diariamente por injeção subcutânea.

Considerando que a BN tem uma alta homologia estrutural com o peptídeo liberador de gastrina (GRP), níveis de gastrina plasmática foram medidos em vários níveis de dose, na tentativa de identificar um nível com efeito biológico sobre a gastrina plasmática, ou seja, uma redução da gastrina dependente do RC-3095. Embora uma tendência de queda da gastrina tenha sido observada em alguns pacientes, os dados foram inconsistentes e com grande variabilidade entre paciente, dificultando, em muito, a interpretação dos resultados.

Tipo	Grau Toxicidade NCTC			
	1 Pacientes (%)	2 Pacientes (%)	3 Pacientes (%)	4 Pacientes (%)
Dor local/induração	5 (20)	-	-	-
Eritema cutâneo	1 (4)	-	-	-
Fadiga	-	-	-	-
Náusea	1 (4)	-	-	-
Vômito	-	-	-	-
Diarréia	-	-	-	-
Mucosite	-	-	-	-
Anemia	-	-	-	-
Leucopenia	-	-	-	-
Trombocitopenia	-	-	-	-

Tabela 3. Incidência de toxicidades relacionada ao RC-3095 por grau de acordo com o CTC nos pacientes incluídos no Estudo Fase I.

NCTC = Critério de Toxicidade Comum do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos

Então, formulamos uma hipótese de “prova de conceito”, em que poderíamos tentar avaliar o efeito de uma única dose de RC-3095 (no maior nível de dose) em um paciente hipergastrinêmico. Para essa proposição, o comitê de ética local, aprovou o estudo de caso-único do efeito do RC-3095 em um paciente com Síndrome de Zollinger-Ellison (altos níveis de gastrina basais). Esse estudo consistiu em uma única injeção do RC-3095 (96µg/kg) por via subcutânea. Os níveis de gastrina basais do paciente, que era vinte vezes acima do limite superior de normalidade, caíram em cerca de 50% após 6 horas da administração (Figura 2).

Estudos farmacocinéticos iniciais realizados com os nossos pacientes não obtiveram sucesso devido a problemas técnicos com o método. Um método analítico confiável para dosagem do RC-3095 no plasma tornou-se disponível somente ao final do estudo [20]. Por essa razão, o plasma coletado no início do estudo foi insuficiente para análises adicionais. Dessa forma, analisamos somente o plasma de dois pacientes incluídos no maior nível de dose (96µg/kg uma vez ao dia). Na tabela 4, os principais parâmetros farmacocinéticos do RC-3095 são apresentados. Na figura 3, as curvas de tempo-concentração plasmática do RC-3095 são apresentados. Deve-se observar que as concentrações antes da aplicação da droga não são zero, sugerindo que o ensaio não é acurado em baixas concentrações.

O efeito do RC-3095 nos níveis plasmáticos de EGF, VEGF e FGF foram estudados em pacientes incluídos no maior nível de dose, porém demonstraram inconsistência de resultados (dados não mostrados). Biópsia de pele também foi coletada de alguns pacientes no maior nível de dose, antes e 14 dias após o início do RC-3095, para análise de expressão de receptores de EGF, VEGF e FGF. Não houve uma correlação clara com o efeito da droga e as mudanças dos níveis dos receptores. A única exceção foi a observação da alta expressão de receptores de GRP na espécie tumoral obtida da paciente com carcinoma de tireóide avançado, para a qual se obteve uma resposta tumoral menor (Figura 4).

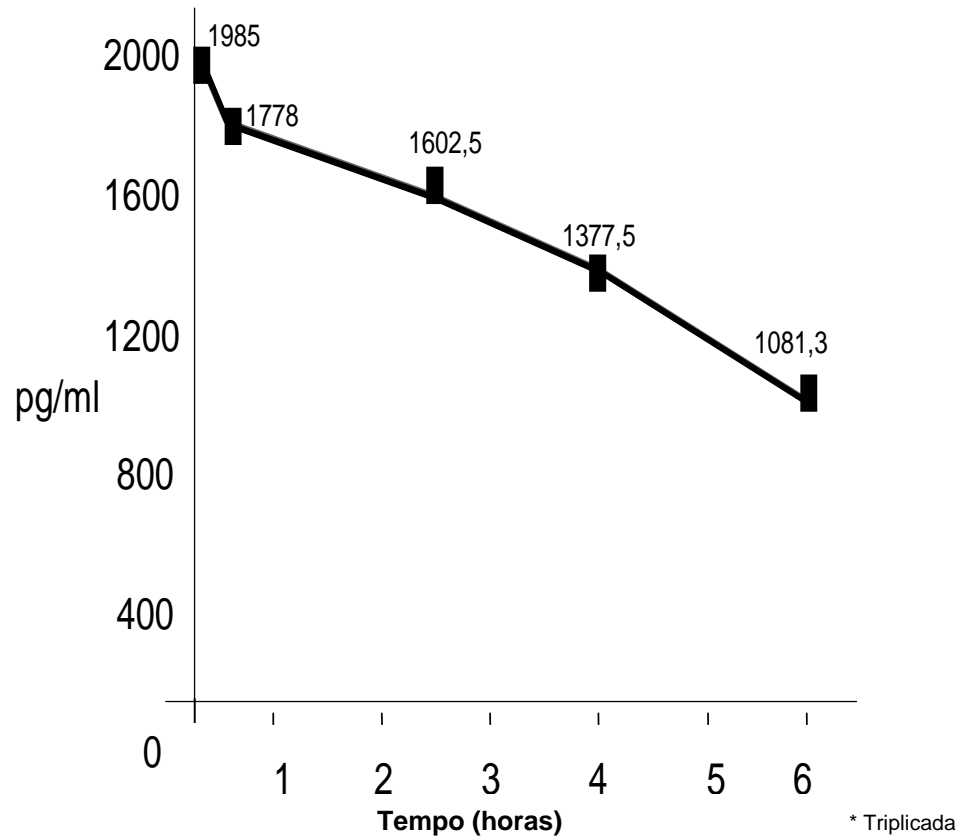


Figura 2. Níveis de gastrina plasmático após administração do RC-3095 (96 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em um paciente com Síndrome de Zollinger-Ellison *

Parâmetro	Paciente AS	Paciente LM
T max (h)	0,067	0,300
Cmax (ng/mL)	640	604
T último (h)	8	8
C última (ng/mL)	115	112
AUC última (h*ng/mL)	1074	1363
λ_z (1/h)	0,080	0,063
T _{1/2} (h)	8,64	10,93
AUC total (h*ng/mL)	1074	1363
AUCINF_obs (h*ng/mL)	2503	3134
Vz_F_obs (L)	29,9	30,2
Cl_F_obs (L/h)	2,4	1,9

Tabela 4. Parâmetros Farmacocinéticos de Dois Pacientes que Receberam RC-3095 por via de Administração SC no Maior Nível de Dose (Nível de Dose VII, 96 µg/kg)*

* Os valores reportados na tabela são baseados no modelo de administração intravenosa.

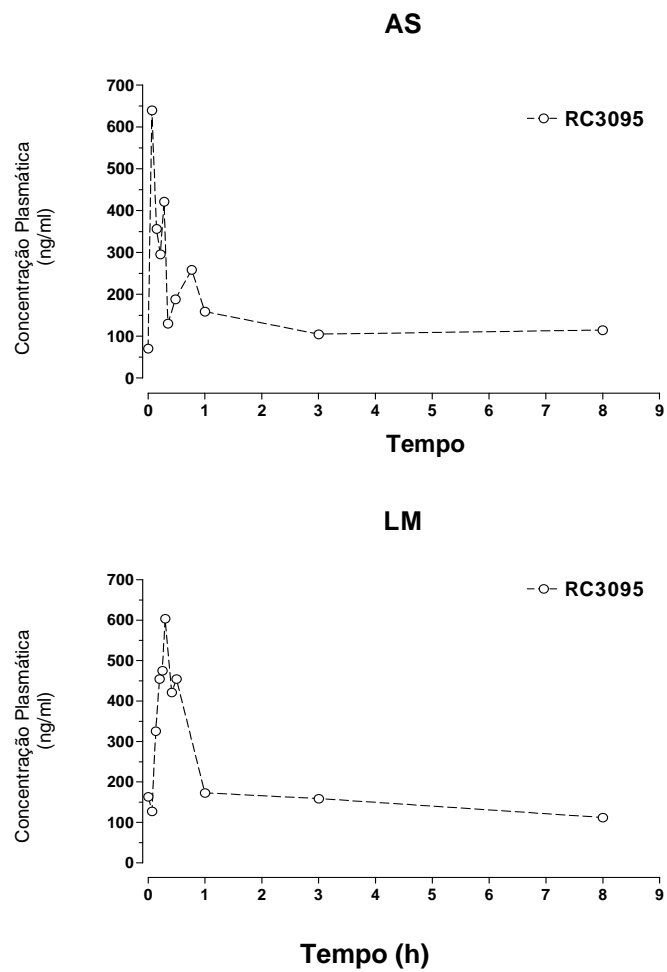


Figura 3. Concentração Plasmática versus Curva de Tempo em Pacientes que receberam RC-3095 por Administração SC na Dose de 96 µg/kg.

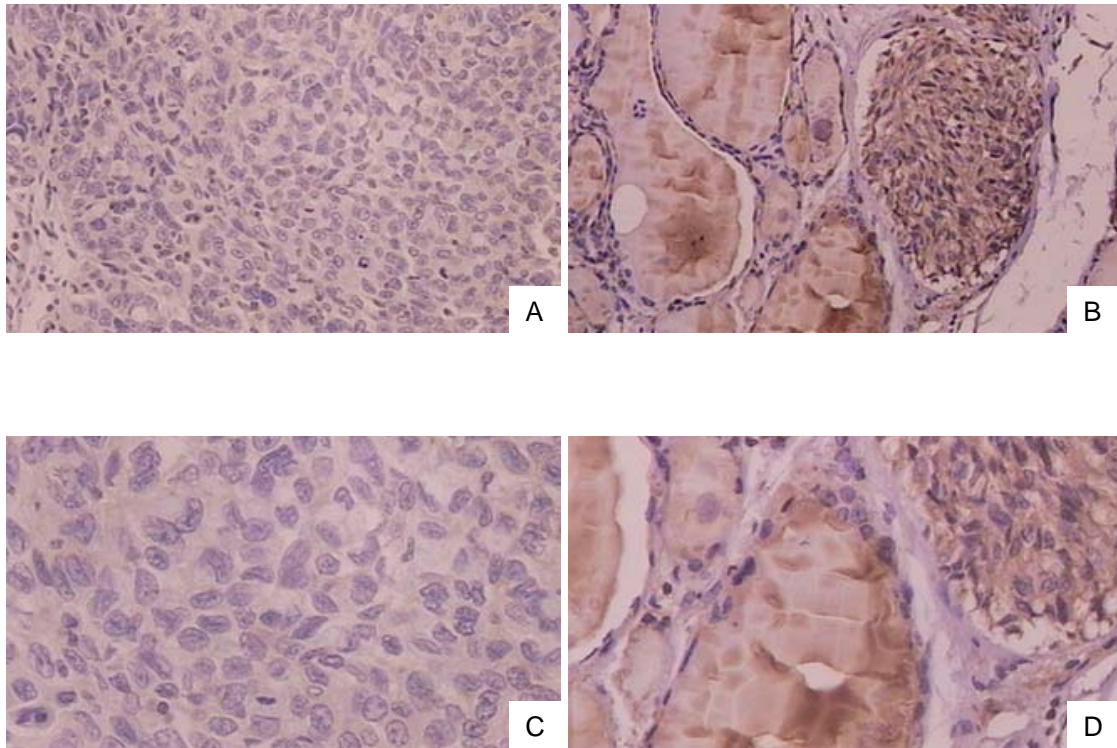


Figura 4. Coloração Anti-GRPR em Tumores. Exemplo de coloração positiva e negativa. A e C mostram um caso de adenocarcinoma de ovário. Nenhuma das colorações ovarianas foram positivas. B e D mostram carcinoma medular de tireóide. Células de folículos normais mostram citoplasma claro e são corados somente por hematoxilina-eosina, sendo consideradas negativas. À direita desses folículos normais, o carcinoma mostra uma forte coloração com o anticorpo, sendo considerado positivo. O folículo colóide foi corado por artefatos técnicos. Todas as amostras foram coradas com Hematoxilina. Painéis superiores com 100 x de magnificação. Painéis inferiores com 200 x de magnificação.

Discussão

Os peptídeos de origem mamífera BN/GRP têm sido reconhecidos como fatores de crescimento em vários tumores humanos [21-25] e possuem amplas atividades neuroendócrinas [26-29]. A inibição dessa via de fator de crescimento com a administração de antagonistas seletivos dos receptores de BN/GRP produziram respostas tumorais impressionantes em modelos experimentais de tumor humano e murino em doses sem efeitos tóxicos significativos [30-33].

Neste trabalho, foram descritos os resultados do primeiro estudo clínico do antagonista dos receptores de BN/GRP, o RC-3095, em pacientes com tumores sólidos avançados. Apesar das várias dificuldades logísticas, principalmente no que diz respeito à formulação e ao suprimento da droga, relevantes informações foram obtidas nesta investigação inicial. Em contraste aos desenhos clássicos dos estudos de fase I, no qual o perfil de toxicidade e a DMT são definidos para estudos de fase II, tentamos incorporar parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica para guiar o escalonamento de dose e identificar uma adequada dose do RC-3095 para ser recomendada em estudos de fase II.

A dose do RC-3095 foi escalonada em grupos de pacientes com tumores avançados refratários aos tratamentos convencionais, de 8 a 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$, administrado diariamente por injeção subcutânea. A falta de toxicidade sistêmica significativa em nossos pacientes confirma os dados prévios do

experimento de animais. Não houve casos de alopecia, toxicidade hematológica ou do TGI nos pacientes que receberam o RC-3095 nesse estudo.

Como houve uma sugestão que o RC-3095 pudesse causar uma regulação para baixo nos receptores de EGF em modelos experimentais e que esse efeito poderia ser maximizado com a administração de duas vezes ao dia (A.V.Schally, comunicação pessoal), o protocolo foi emendado dos níveis de dose IV ao VI. Todavia, a dor local no sítio da injeção tornou-se dose limitante nos grupos subsequentes, visto que as injeções repetidas do RC-3095 foram fonte de desconforto nos pacientes dos grupos de altas doses. Por esse motivo, decidimos retornar a uma aplicação ao dia na dose de 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (nível de dose VII), que foi bem tolerado pelos pacientes.

Considerando a alta homologia estrutural entre a BN e o GRP, os níveis plasmáticos de gastrina foram estudados nos nossos pacientes, como um potencial marcador de efeito biológico do RC-3095. Embora estes níveis tenham diminuído em alguns pacientes após a administração do RC-3095, houve uma grande variabilidade entre pacientes; não pudemos usar com segurança esses níveis de gastrina para guiar nosso escalonamento de dose. Por essa razão, incorporamos ao estudo uma prova conceitual, que consistiu em administrar uma dose única de 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do RC-3095 em um indivíduo com Síndrome de Zollinger-Ellison (hipergastrinemia basal por definição). Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA e o paciente assinou um termo de consentimento informado. Interessantemente, os níveis de gastrina diminuíram 50% em 6 horas após a administração da droga. Essa

observação pode ser relacionada ao efeito da droga ou, simplesmente, ter ocorrido pela variação circadiana.

Evidência de efeito antitumoral do RC-3095 foi observada em uma paciente incluída nesse estudo, embora não tenham sido alcançados critérios de resposta objetiva. Esse caso foi de uma paciente com carcinoma medular de tireóide avançado que obteve uma resposta menor de curta duração em uma massa linfonodomegálica metastática em região supraclavicular. Apesar dessa resposta não ter sido documentada por exames de imagem seqüenciais, essa lesão foi medida em dois diâmetros perpendiculares durante várias ocasiões por mais de um médico da nossa equipe. A paciente também obteve resolução de uma diarreia secretora, que era refratária a vários tratamentos sintomáticos utilizados, inclusive o uso de altas doses de loperamida e somatostatina. A revisão da suas lâminas histopatológicas confirmou a expressão de receptores de GRP no tumor, fato que talvez explique o efeito biológico observado com o nosso antagonista da bombesina RC-3095. A observação da alta expressão de receptores de GRP em carcinoma medular de tireóide e outros tumores já foi previamente descrita [34,35].

Posteriormente, um método rápido e sensível de quantificação do RC-3095 por LC-MS/MS tornou-se disponível [20]. Uma revisão das limitadas amostras de plasma obtidas de dois pacientes incluídos no maior nível de dose sugeriu que o atual ensaio tem uma reduzida acurácia em baixas concentrações da droga. Nossos resultados, porém merecem novos estudos, porque a concentração plasmática do RC-3095 nos pacientes está dentro da

faixa previamente reportada em tumores de camundongos que responderam à droga (> 100 ng/ml em cerca de 8 horas) [19].

Baseado nos dados obtidos dos primeiros 25 pacientes com tumores sólidos avançados expostos ao RC-3095, em vários níveis de doses, nenhuma toxicidade sistêmica foi relatada. Desconforto local no sítio da injeção nos maiores níveis de dose foi o único efeito adverso demonstrado em nossos pacientes. Essa foi a maior limitação em continuar o nosso procedimento de escalonamento de dose. Considerando as dificuldades encontradas por nós em completar a análise de segurança do RC-3095, esse estudo pode ser considerado incompleto em relação à recomendação da dose e da posologia a serem aplicados em futuros estudos. Estudos posteriores são necessários para melhor entendermos e avaliarmos o comportamento farmacocinético dessa nova e interessante abordagem terapêutica experimental.

Referências

1. Ohki-Hamazaki, H., Iwabuchi, M., Maekawa, F. (2005). Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. **Int J Dev Biol.** 49: 293-300.
2. Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A., Minna, J.D. (1985). Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. **Nature**, 316: 823-826.
3. Nelson, J., Dornelly, M., Walker, B., Gray, J., Shaw, C., Murphy, R.F. (1991). Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. **Br J Cancer.** 63: 933-936.
4. Bologna, M., Gestuccia, C., Muzi, P., Ciomei, M. (1989). Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells *in vitro*. **Cancer.** 63: 1714-1720.
5. Carney, D.N., Cuttitta, F., Moody, T.W., Minna, J.D. (1987). Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. **Cancer Res.**, 47: 821-825.
6. Sun, B., Schally, A.V., Halmos, G. (2000). The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. **Regul Pept.**, 90:77-84.
7. Qin, Y., Ertl, T., Cai, R.-Z., Halmos, G., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. **Cancer Res.**, 54: 1035-1041.
8. Hajri, A., Balboni, G., Koenig, M., Garaud, J.C., Damge, C. (1992). Gastrin-releasing peptide: *in vivo* and *in vitro* growth effects on an acinar pancreatic carcinoma. **Cancer Res.**, 52: 3726-3732.
9. Kelley, M.J., Linnoila, R.I., Avis, I.L., Georgiadis, M.S., Cuttitta, F., Mulshine, J.L., Johnson, B.E. (1997). Antitumor activity of a monoclonal antibody directed against gastrin-releasing peptide in patients with small cell lung cancer. **Chest**, 112: 256-261.

10. Cai, R-Z., Radulovic, S., Pinsky, J., Nagy, A., Redding, T.W., Olsen, T.B., Schally, A.V. (1992). Pseudononapeptide bombesin antagonists containing C-terminal Trp or Tpi. **Peptides**. 13:267-271.
11. Cai, R-Z., Reile, H., Armatis, P., Schally, A.V. (1994). Potent BN antagonists with C-terminal LeuΨ(CH₂-N)Tac-NH₂ or its derivative. **Proc Natl Acad Sci USA**. 91: 12664-12668.
12. Pinski, J., Yano, T., Rekasi, Z., Cai, R-Z., Radulovic, S., Schally, A.V. (1992). High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. **Regul Pept**. 41: 185-193.
13. Kiaris, H., Schally AV, Sun B, Armatis P, Groot K. (1999). Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. **Oncogene**, 18:7168-73.
14. Yano, T., Pinski, J., Groot, K. Schally, A.V. (1992). Stimulation and inhibition by bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. **Cancer Res**. 52: 4545-4547.
15. Qin, Y., Halmos, G., Cai, R.-Z., Szoke, B., Ertl, T., Schally, A.V. (1994). 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.
16. Chatzistamou, I., Schally, A.V., Sun, B., Armatis, P., Szepeshazi, K. (2000). 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.
17. Koppan, M., Halmos, G., Arencibia, J.M., Lamharzi, N., Schally, A.V. (1998). Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3040-II inhibit tumor growth and decrease the level and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. **Cancer**. 83: 1335-1343.
18. Bajo, A.M., Schally, A.V., Groot, K., Szepeshazi, K. (2004). Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. **Br J Cancer**. 90:245-252.
19. Szepeshazi, K., Schally, A.V., Halmos, G., Lamharzi, M., Groot, K., Horvath, J.E. (1997). A single *in vivo* administration of bombesin antagonist RC-

3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MTX mouse mammary cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94: 10913-10918.

20. Pereira, A.S., DiLeone, L., Souza, F.H., Lilla, S., Richter, M., Schwartzmann, G., De Nucci, G. (2005). Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatography B**, 816:321-326.

21. Pinski, J., Reile, H., Halmos, G., Groot, K., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. **Cancer Res.**, 54:169-174.

22. Pinski, J., Halmos, G., Yano, T., Szepeshazi, K., Qin, Y., Ertl, T., Schally, A.V. (1994). Inhibition of growth of MKN-45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analog RC-160. **Int. J. Cancer**, 57:574-580.

23. Liebow, C., Crean, D.H., Lee, M.T., Kamer, A.R., Mang, T.S., Schally, A.V. (1994). Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91:3804-3808.

24. Schwartzmann, G. (2004). Dexamethasone and gastrin-releasing peptide receptors in human lung cells. **Lung Cancer**, 46:129.

25. Radulovic, S., Miller, G., Schally, A.V. (1991). 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.

26. Radulovic, S., Schally, A.V., Reile, H., Halmos, G., Szepeshazi, K., Groot, K., Milovanovic, S., Miller, G., Yano, T. (1994). Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. **Acta Oncol.**, 33:693-701.

27. Roesler, R., Henriques, J.A., Schwartzmann, G. (2004). Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. **Trends Pharmacol Sci**. 25:241-242.

28. Roesler, R., Kopschina, M.I., Rosa, R.M., Henriques, J.A., Souza, D.O., Schwartzmann, G. (2004). RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. **Eur J Pharmacol.**, 486:35-41.
29. Roesler, R., Lessa, D., Venturella, R., Viana, M.R., Luft, T., Henriques, J.A., Izquierdo, I., Schwartzmann, G. (2004). Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdale regulate memory consolidation. **Eur J Neurosci.**, 19:1041-1045.
30. Shirahige, Y., Cai, R.-Z., Szepeshazi, K., Halmos, G., Pinski, J., Groot, K., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effect of bombesin gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3095-II and RC-3095 on MCF7 MIII human breast cancer xenografts in nude mice. **Biomed. Pharmacother.**, 48: 465-472.
31. Szepeshazi, K., Schally, A.V., Halmos, G., Groot, K., Radulovic, S. (1992). Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen-independent MXT mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095. **J. Natl. Cancer Inst.**, 84: 1915-1922.
32. Szepeshazi, K., Schally, A.V., Groot, K., Halmos, G. (1993). Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP)(14-27) and bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 on growth of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. **Int. J. Cancer**, 54:282-289.
33. Yano, T., Pinski, J., Szepeshazi, K., Halmos, G., Radulovic, S., Groot, K., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effect of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. **Cancer**, 73:1229-1238.
34. Ide, A. Ashizawa, K. Ishikawa, N., Ishii, R., Ando, T., Abe, Y., Sera, N., Usa, T., Tominaga, T., Ejima, E., Nakashima, M., Ito, K., Ito, K., Eguchi, K. (2001). Elevation of serum pro-gastrin-releasing peptide in patients with medullary thyroid carcinoma and small cell lung carcinoma. **Thyroid**, 11: 1055-1061.
35. Weber, C.J., O'Doriso, T.M., Howe, B., D'Agati, V., Ward, L., Russell, J., Feind, C.R. (1991). Vasoactive intestinal polypeptide-, neurotensin-, substance P-, gastrin-releasing peptide-, calcitonin-, calcitonin gene related peptide-, and somatostatin-like immunoreactivities in human parathyroid glands. **Surgery**, 110:1078-1085.

PARTE 3

CONCLUSÕES

Foi possível descrever os principais parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos do RC-3095 em pacientes com tumores sólidos avançados. Houve excelente tolerância ao RC-3095, apresentando apenas toxicidade local no sítio de administração. Não foi possível recomendar uma dose do RC-3095 para estudos subseqüentes, devido a limitações em sua formulação, o que não permitiu o escalonamento de doses por toxicidade no local de administração. Modificações em sua formulação e/ou o desenvolvimento de análogos com maior facilidade de administração são altamente desejáveis.

Como conclusões específicas podemos citar:

a) Foi validado um método rápido e sensível para dosagem da droga no plasma através de LC-MS/MS com um bom nível de detecção;

b) Os principais parâmetros farmacocinéticos da droga em plasma humano foram:

- T máximo entre 0,067 a 0,3 horas;
- C máxima entre 604 a 640 ng/ ml;
- $T_{1/2}$ entre 8,64 a 10,93 horas;
- AUC última entre 1074 a 1363 hora*ng/ml;
- $V_z_F_obs$ (L) entre 29,9 e 30,2;
- Cl_F_obs entre 1,9 e 2,4.

c) Não foi observada toxicidade sistêmica;

d) Há evidência de que a dose 96 µg/kg por via subcutânea, 1 x ao dia possui uma ação biológica; entretanto, por efeitos locais no sítio de administração não foi possível atingir uma TDL;

e) Houve uma regressão tumoral parcial em uma paciente com carcinoma medular de tireóide avançado, que expressava receptores para GRP;

f) Não houve efeito consistente nos níveis de fatores de crescimento tumoral e nas concentrações de gastrina plasmática.

g) Não foi possível recomendar com segurança uma dose para estudos subseqüentes. É importante que seja realizado aprimoramento na formulação do RC-3095, ou que se desenvolva análogos com igual atividade antitumoral, mas uma formulação com melhor aceitação para uso em humanos.

PERSPECTIVAS

O RC-3095 é um antagonista de receptores de BN/GRP, cuja atividade antitumoral em modelos experimentais e mecanismo de ação o tornam um candidato de grande interesse clínico. Nosso estudo confirmou a sua segurança para uso em seres humanos. Estudos posteriores devem ser realizados no sentido de definir com maior precisão uma dose e esquema de administração deste agente, para que possam ser iniciados estudos clínicos de fase II em pacientes com tumores avançados, os quais expressem receptores para BN/GRP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (PARTE 1 E PARTE 3)

Anastasi, A., Erspamer, V., Bucci, M. (1971). Isolation and structure of a bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. **Experientia**, 27: 166-167.

Bajo, A.M., Schally, A.V., Krupa, M., Hebert, F., Groot, K., Szepeshazi, K. (2002). Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 99:3836-41.

Bajo, A.M., Schally, A.V., Groot, K., Szepeshazi, K. (2004). Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. **Br J Cancer**. 90:245-52.

Batthey, J.F., Way, J., Corjay, M.H., Shapira, H., Kusano, K., Harkins, R., Wu, J.M., Slattery, T., Mann, E., Feldman, R. (1991). Molecular cloning of a bombesin/GRP receptor from Swiss 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 395-399.

Bold, R.J., Ishizuka, J., Yao, C.Z., Townsend, C.M., Thompson, J.C. (1998). Bombesin stimulates *in vitro* growth of human breast cancer independent of estrogen receptor status. **Anticancer Res.**, 18: 4051-4056.

Broccardo, M., Erspamer, G.F., Melchiorri, P., De Castiglione, R. (1975). Relative potency of bombesin-like peptides. **Br J. Pharmacol.**, 55:221-227.

Brown, M.R., Rivier, J., Vale, W. (1987). Bombesin affects the central nervous system to produce hyperglycemia in rats. **Life Sci.**, 21: 1729-1734.

Budillon, A., Tagliaferi, P., Caraglia, M., Torrisi, M.R., Normanno, N., Iacobelli, S., Palmieri, G., Stoppelli, M.P., Frati, L., Bianco, A.R. (1991). Upregulation of epidermal growth factor receptor induced by alpha-interferon in human epidermoid cancer cells. **Cancer Res.**, 51: 1294-1299.

Camble, R., Cotton, R., Dutta, A.S. (1989). N-isobutyryl-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-NHMe (ICI 216140) a potent *in vivo* antagonist analogue of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) derived from the C-terminal sequence lacking the final methionine residue. **Life Sci.**, 45: 1521-1527.

Cardona, C., Rabbitts, P.H., Spindel, E.R., Ghatei, M.A., Bleehen, N.M., Bloom, S.R., Reeve, J.G. (1991). Production of neuromedin B and neuromedin B gene expression in human lung tumor cell lines. **Cancer Res.**, 48: 5205-5211.

Carney, D.N., Cuttitta, F., Moody, T.W., Minna, J.D. (1987). Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. **Cancer Res.**, 47: 821-825.

Charitopoulos, K.N., Lazaris, A.C., Aroni, K., Kavantzias, N., Nikolakopoulou, E., Davaris, P. (2000). Immunodetection of gastrin-releasing peptide in malignant melanoma cells. **Melanoma Res.**, 10:395-400.

Chatzistamou, I., Schally, A.V., Szepeshazi, K., Groot, K., Hebert, F., Arencibia, J.M. (2001). Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. **Cancer Lett.**, 171(1):37-45.

Chave, H.S., Gough, A.C., Palmer, K., Preston, S.R., Primrose, J.N. (2000). Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. **Br J. Cancer**, 82: 124-130.

Chronwall, B.M., Pisano, J.J., Bishop, J.F., Moody, T.W., O'Donohue, T.L. (1985). Biochemical and histochemical characterization of ranatensin immunoreactive peptides in rat brain: lack of coexistence with bombesin/GRP. **Brain Res.**, 338: 97-113.

Clapham, J.C., Arch, J.R., Tadayyon, M. (2001). Anti-obesity drugs: a critical review of current therapies and future opportunities. **Pharmacol. Ther.**, 89: 81-121.

Coy, D.H., Taylor, J.E., Jiang, N.-Y., Klein, S.H., Wang, L.H., Huang, S., Moreau, J.P., Gardner, J.D., Jensen, R.T. (1989). Short-chain pseudopeptide bombesin receptor antagonists with enhanced binding affinities for pancreatic acinar and Swiss 3T3 cells display strong antimitotic activity. **J. Biol. Chem.**, 264: 14691-14697.

Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A., Minna, J.D. (1985a). Autocrine growth factor in human small-cell lung cancer. **Cancer Surv.**, 4: 707-727.

Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A., Minna, J.D. (1985b). Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. **Nature**, 316: 823-826.

Daí, J., Shen, R., Sumitomo, M., Stahl, R., Navarro, D., Gershengorn, M.C., Nanus, D.M. (2002). Synergistic activation of the androgen receptor by bombesin and low-dose androgen. **Clin Cancer Res.**, 8:2399-405.

Dal-Pizzol F., Di Leone L.P., Ritter C., Martins M.R., Reinke A., Pens Gelain, D., Zanotto-Filho, A., de Souza, L.F., Andrades, M., Barbeiro, D.F., Bernard, E.A., Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Soriano, F.G., Claudio, J., Moreira, F., Roesler,

R., Schwartsmann,G. (2006). Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. **Am J Respir Crit Care Med.** 173:84-90.

Damstrup, L., Rygaard, K., Spang-Thomsen, M., Poulsen, H.S. (1992). Expression of the epidermal growth factor receptor in human small cell lung cancer cell lines. **Cancer Res.**, 52: 3089-3093.

Draoui, M., Moody, T.W., Fathi, Z., Battey, J. (1993). GRP gene expression is stimulated in small cell line cancer cells by phorbol ester. **Cell Growth Differ.**, 4: 723-729.

Dutta, A.S. (1993). Chapter 2; In: Small Peptides: chemistry, biology and clinical studies, 1993. Vol. 19 (H. Timmermann, Eds), Elsevier, Amsterdam.

Engel, J.B., Keller, G., Schally, A.V., Halmos, G., Hammann, B., Nagy, A. (2005a). Effective inhibition of experimental human ovarian cancers with a targeted cytotoxic bombesin analogue AN-215. **Clin Cancer Res.** ,11:2408-15.

Engel, J.B., Schally, A.V., Halmos, G., Baker, B., Nagy, A., Keller, G. (2005b). Targeted cytotoxic bombesin analog AN-215 effectively inhibits experimental human breast cancers with a low induction of multi-drug resistance proteins. **Endocr Relat Cancer**, 12:999-1009.

Engel, J.B., Schally, A.V., Halmos, G., Baker, B., Nagy, A., Keller, G. (2005c). Experimental therapy of human endometrial cancers with a targeted cytotoxic bombesin analog AN-215: low induction of multidrug resistance proteins. **Eur J Cancer**, 41:1824-30.

Fathi, Z., Corjay, M.H., Shapira, H., Wada, E., Benya, R., Jensen, R., Viallet, J., Sausville, E.A., Battey, J.F. (1993). BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. **J. Biol. Chem.**, 268: 5979-5984.

Fathi, Z., Way, J.W., Corjay, M.H., Viallet, J., Sausville, E.A., Battey, J.F. (1996). Bombesin receptor structure and expression in human lung carcinoma cell lines. **J. Cell Biochem. Suppl.**, 24: 237-246.

Festuccia, C., Angelucci, A., Gravina, G., Eleuterio, E., Vicentini, C., Bologna, M. (2002). Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement. **Exp Cell Res.**,280:1-11.

Fleischmann, A., Waser, B., Gebbers, J.O., Reubi, J.C.(2005) Gastrin-releasing peptide receptors in normal and neoplastic human uterus:involvement of multiple tissue compartments. **J Clin Endocrinol Metab.**,90:4722-9.

Giaccone, G., Battey, J., Gazdar, A.F., Oie, H., Draoui, M., Moody, T.W. (1992). Neuromedin is present in lung cancer cell lines. **Cancer Res.**, 52 (Suppl.): S2732-S2736.

Gibbs, J. Fauser, D., Rowe, E., Rolls, B., Rolls, E., Maddison, S. (1979). Bombesin supresses feeding in rats. **Nature**, 282: 208-210.

Gill, G.N., Bertics, P.J., Santon, J.B. (1987). Epidermal growth factor and its receptor. **Mol. Cell Endocrinol.**, 51: 169-186.

Gokhale, J.A., Jones-Blackett, T., 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.

Gu, Q., Lee, L.Y. (2005). Sensitization of pulmonary chemosensitive neurons by bombesin-like peptides in rats. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**; 289:L1104-12.

Gugger, M., Reubi J.C. (1999). Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. **Am. J. Pathol.** , 155:2067-2076.

Hajri, A., Balboni, G., Koenig, M., Garaud, J.C., Damge, C. (1992). Gastrin-releasing peptide: *in vivo* and *in vitro* growth effects on an acinar pancreatic carcinoma. **Cancer Res.**, 52: 3726-3732.

Halmos, G., Schally, A.V. (1997). 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**, 94: 956-960.

Han, K., Chevalier, S., Viallet, J., Bazinet, M., Aprikian, A.G. (1995). Bombesin induced signal transduction in androgen-insensitive human prostata cancer cells. **Proc.Annu.Meet.Am.Assoc.Cancer Res.**, 36:A247.

Heimbrook, D.C., Saari, W.S., Balishin, N.L., Friedman, A., Moore, K.S., Riemen, M.W., Kiefer, D.M., Rotberg, N.S., Wallen, J.W., Oliff, A. (1989). Carboxyl-terminal modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. **J. Biol. Chem.**, 264: 11258-11262.

Heuser, M., Schlott, T., Schally, A.V., Kahler, E., Schliephake, R., Laabs, S.O., Hemmerlein, B. (2005). Expression of gastrin releasing Peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. **J Urol.**, 173:2154-9.

Holst, J.J., Knuhtsen, S., Nielson, O.V. (1989). Role of gastrin-releasing peptide in neural control of pancreatic exocrine secretion. **Pancreas**, 4: 581-586.

Iwabuchi, M., Ui-Tei, K., Yamada, K., Matsuda, Y., Sakai, Y., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2003). **Br J Pharmacol** 139: 555-566. Molecular cloning and characterization of avian bombesin-like peptide receptors: new tools for investigating molecular basis for ligand selectivity.

Jungwirth, A., Pinski, J., Galvan, G., Halmos, G., Szepeshazi, K., Cai, R.Z., Groot, K., Vadillo-Buenfil, M., Schally, A.V. (1997). Inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer *in vivo* by luteinising hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II. **Eur J Cancer**, 33: 1141-1148.

Kahan, Z., Sun, B., Schally, A.V., Arencibia, J.M., Cai, R.Z., Groot, K., Halmos, G. (2000). 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**, 88:1384-92.

Kanashiro, C.A., Schally, A.V., Nagy, A., Halmos, G. (2005). Inhibition of experimental U-118MG glioblastoma by targeted cytotoxic analogs of bombesin and somatostatin is associated with a suppression of angiogenic and antiapoptotic mechanisms. **Int J Oncol**. 27:169-74.

Kent, P., Anisman, H., Merali, Z. (1997). Are bombesin-like peptides involved in the mediation of stress response? **Life Sci.**, 62: 103-109.

Kim, H.J., Evers, M.B., Banker, N.A., Greeley, G.H., Hellmich, M.R., Thompson, J.C., Townsend, C.M. (1998). Novel expression and regulation of gastrin gene in human ovarian cancer cell line, SW626. **Diges. Diseas. Sci.**, 43: 1465-1473.

Knuhtsen, S., Holst, J.J., Jensen, S.L., Knigge, U., Nielson, O.V. (1985). Gastrin-releasing peptide: effect on exocrine secretion and release from isolated perfused porcine pancreas. **Am. J. Physiol.**, 248: G281-G286.

Lango, M.N., Dyer, K.F., Lui, V.W., Gooding, W.E., Gubish, C., Siegfried, J.M., Grandis, J.R. (2002) Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Natl Cancer Inst.**,94:375-83.

Lebacqz-Verheyden, A.M., Trepel, J., Sausville, E.A., Battey, J. (1990). Bombesin and gastrin-releasing peptide: neuropeptides, secretagogues, and growth factors. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Sporn, M.B., (eds). Vol. 95/II, Peptide growth factors and their receptors II. Berlin. Springer-Verlag, pp. 71-124.

Lee, M.T., Liebow, C., Krebs, L.J., Schally, A.V. (1993). Bombesin and gastrin-releasing peptide (GRP) induce phosphorylation and up-regulation of epidermal growth factor receptor. **Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.**, 34: 244.

Levine, L., Licci, J.A 3rd, Pazdrak, B., Cheng, J.Z., Guo, Y.S., Townsend, C.M. Jr., Hellmich, M.R. (2003). Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. **Cancer Res.** 63:3495-502.

Liebow, C., Crean, D.H., Lee, M.T., Kamer, A.R., Mang, T.S., Schally, A.V. (1994). Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 3804-3808.

Liebow, C., Crean, D.H., Schally, A.V., Mang, T.S. (1993). Peptide analogues alter the progression of premalignant lesions, as measured by Photofrin fluorescence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 1897-1901.

Lui, V.W., Thomas, S.M., Zhang, Q., Wentzel, A.L., Siegfried, J.M., Li, J.Y., Grandis, J.R. (2003). Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. **Oncogene** ;22:6183-93.

Macaulay, V.M., Everard, M.J., Teale, J.D., Trott, P.A., Van Wyk, J.J., Smith, I.E., Millar, J.L. (1990). Autocrine function for insulin-like growth factor I in human small cell lung cancer cell lines and fresh tumor cells. **Cancer Res.**, 50: 2511-2517.

Mahmoud, S., Staley, J., Taylor, J., Bodgen, A., Moreau, J.P., Coy, D., Avis, I., Cuttitta, F., Mulshine, J.L., Moody, T.W. (1991). [Psi 13,14] bombesin analogues inhibit growth of small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Res.**, 51: 1798-1802.

Markwalder, R., Reubi, J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer: relation to neoplastic transformation. **Cancer Res.**, 59:5, 1152-1159, 1999.

McDonald, T.J., Nilson, G., Vagne, M., Bloom, S.R., Mutt, V. (1978) A gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. **Gut**, 19: 767-774,.

Merali, Z., Johnston, S., Zakman, S. (1983). Bombesin induced behavioral changes: antagonism by neuropeptides. **Peptides**, 4: 693-699.

Milovanovic, S.R., Radulovic, S., Groot, K., Schally, A.V. (1992). 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 somatostatin analog RC-160. **Prostaglandins**, 20: 269-280.

Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1983). Neuromedin B: a novel bombesin like peptide identified in porcine spinal cord. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 114: 541-548.

Minamino, N., Sudoh, T., Kangawa, K., Matsuo, H. (1985). Neuromedin B-32 and B-30: two big neuromedin B identified in porcine brain and spinal cord. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 130: 685-691.

Minuto, F., Del Monte, P., Barreca, A., Alama, A., Cariola, G., Giordano, G. (1988). Evidence for autocrine mitogenic stimulation by somatomedin-C/insulin-like growth factor I on an established human lung cancer cell line. **Cancer Res.**, 48: 3716-3719.

Moody, T.W., Cuttitta, F. (1993). Growth factor and peptide receptors in small cell lung cancer. **Life Sci.**, 52:1161-1173.

Moody, T.W., Mantey, S.A., Pradhan, T.K., Schumann, M., Nakagawa, T., Martinez, A., Fuselier, J., Coy, D.H., Jensen, R.T. (2004). Development of high affinity camptothecin-bombesin conjugates that have targeted cytotoxicity for bombesin receptor-containing tumor cells. **J Biol Chem.** ,279:23580-9.

Moody, T.W., Pert, C.B., Gazdar, A.F., Carney, D.N., Minna, J.D. (1981). High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. **Science**, 214: 1246-1248.

Moody, T.W., Staley, J., Zia, F., Coy, D.H., Jensen, R.T. (1986). Neuromedin B binds with high affinity, elevates cytosolic calcium and stimulates the growth of small cell lung cancer cell lines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 263: 311-317.

Moody, T.W., Venugopal, R., Zia, F., Patierno, S., Leban, J.J., McDermed, J. (1995). BW2258: a GRP receptor antagonist which inhibits small cell lung cancer growth. **Life Sci.**, 5: 521-529.

Nagalla, S.R., Barry, B.J., Creswick, K.C., Eden, P., Taylor, J.T., Spindel, E.R. (1995). Cloning of a receptor for amphibian (Phe¹³)bombesin distinct from the receptor for GRP: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB₄). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 6205-6209.

Ohki-Hamazaki, H., Sakai, Y., Kamata, K., Ogura, H., Okuyama, S., Watase, K., Yamada, K., Wada, K. (1999). Functional properties of two bombesin-like peptide receptors revealed by the analysis of mice lacking neuromedin B receptor. **J. Neurosci.**, 19: 948-954.

Ohki-Hamazaki, H., Wada, E., Matsui, K., Wada, K. (1997). Cloning and expression of neuromedin B receptor and the third subtype of bombesin receptor genes in the mouse. **Brain Res.**, 762: 165-172.

Pansky, A., De Weerth, A., Fasler-Kan, E., Boulay, J.L., Schulz, M., Ketterer, S., Selck, C., Beglinger, C., Von Schrenck, T., Hildebrand, P. (2000). Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. **J Am Soc Nephrol.**, 11:1409-18.

Panula, P., Yang, H.Y., Costa, E. (1982). Neuronal location of the bombesin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. **Regul Pept.**,4:275-83.

Panula, P. (1986). Histochemistry and function of bombesin-like peptides. **Med. Biol.**, 64:177-192.

Peng, D., Fan, Z., Lu, Y., DeBlasio, T., Scher, H., Mendelsohn, J. (1996). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. **Cancer Res.**, 56: 3666-3669.

Pinski, J., Halmos, G., Szepeshazi, K., Schally, A.V. (1993). 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.

Pinski, J., Halmos, G., Yano, T., Szepeshazi, K., Qin, Y., Ertl, T., Schally, A.V. (1994). Inhibition of growth of MKN-45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analog RC-160. **Int. J. Cancer**, 57: 574-580.

Pinski, J., Reile, H., Halmos, G., Groot, K., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. **Cancer Res.**, 54: 169-174.

Pinski, J., Schally, A.V., Halmos, G., Szepeshazi, K. (1993).. 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.

Qin, Y., Ertl, T., Cai, R.-Z., Halmos, G., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. **Cancer Res.**, 54: 1035-1041.

Qin, Y., Ertl, T., Cai, R.-Z., Horvath, J.E., Groot, K., Schally, A.V. (1995). 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.

Qin, Y., Halmos, G., Cai, R.-Z., Szoke, B., Ertl, T., Schally, A.V. (1994). 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.

Radulovic, S., Cai, R.-Z., Serfozo, P., Groot, K., Redding, T.W., Pinski, J., Schally, A.V. (1991). Biological effects and receptor binding affinities of new pseudononapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. **Int. J. Peptide Protein Res.**, 38: 593-600.

Radulovic, S., Miller, G., Schally, A.V. (1991). 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.

Radulovic, S., Schally, A.V., Reile, H., Halmos, G., Szepeshazi, K., Groot, K., Milovanovic, S., Miller, G., Yano, T. (1994). Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. **Acta Oncol.**, 33: 693-701.

Reeve, J.G., Morgan, J., Schwander, J., Bleehen, N.M. (1993). Role for membrane and secreted insulin-like growth factor-binding protein-2 in the regulation of insulin-like growth factor action in lung tumors. **Cancer Res.**, 53: 4680-4685.

Roesler, R., Henriques, J.A., Schwartzmann, G. (2004). Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as a novel therapeutic targets. **Trends Pharmacol Sci.**, 25:241-242.

Roesler, R., Kopschina, M.I., Rosa, R.M., Henriques, J.A., Souza, D.O., Schwartzmann, G. (2004). RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. **Eur J Pharmacol.**, 486:35-41.

Roesler, R., Lessa, D., Venturella, R., Viana, M.R., Luft, T., Henriques, J.A., Izquierdo, I., Schwartzmann, G. (2004). Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdale regulate memory consolidation. **Eur J Neurosci.**, 19:1041-1045.

Roesler, R., Meller, C.A., Kopschina, M.I., Souza, D.O., Henriques, J.A., Schwartzmann, G. (2003). Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. **Peptides**, 24:1069-74.

Rozengurt, E., Sinnott-Smith, J. (1983). Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80: 2936-2940.

Saari, W.S., Heimbrook, D.C., Friedman, A., Fisher, T.W. (1989). A gastrin-releasing peptide antagonist containing A psi (CH₂O) amide bond surrogate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 114-117.

Saurin, J.C., Fallavier, M., Sordat, B., Gevrey, J.C., Chayvialle, J.A., Abello, J. (2002). Bombesin stimulates invasion and migration of Isreco1 colon carcinoma cells in a Rho-dependent manner. *Cancer Res.*, 62:4829-35.

Saurin, J.C., Némoz-Gaillard, E., Sordat, B., Cuber, J.C., Coy, D.H., Abello, J., Chayvialle, J.A. (1999). Bombesin stimulates adhesion, spreading, lamellipodia formation, and proliferation in the human colon carcinoma Isreco1 cell line. *Cancer Res.*, 59:962-967.

Schwartzmann, G. (2004). Dexamethasone and gastrin-releasing peptide receptors in human lung cells. *Lung Cancer*, 46:129.

Seretis, E.C., Agnantis, N.J., Golematis, V.C., Voloudakis-Balatzis, I.E. (2004). Electron immunocytochemical demonstration of serotonin, vasoactive intestinal polypeptide, bombesin, somatostatin and glucagon in mirror biopsies from primary colorectal adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.*, 23:477-84.

Shirahige, Y., Cai, R.-Z., Szepeshazi, K., Halmos, G., Pinski, J., Groot, K., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effect of bombesin gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3095-II and RC-3095 on MCF7 MIII human breast cancer xenografts in nude mice. *Biomed. Pharmacother.*, 48: 465-472.

Siegfried, J.M., Krishnamachary, N., Gaither Davis, A., Gubish, C., Hunt, J.D., Shriver, S.P. (1999). Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm. Pharmacol. Therp.*, 12: 291-302.

Spindel, E.R., Giladi, E., Brehm, P., Goodman, R.H., Segerson, T.P. (1990). Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Mol Endocrinol.*, 4: 1956-1963.

Spindel, E.R., Giladi, E., Segerson, T.P., Nagalla, S. (1993). Bombesin-like peptides: ligands and receptors. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 48: 365-391.

Sun, B., Halmos, G., Schally, A.V., Wang, X., Martinez, M. (2000). Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancer. *Prostate*, 42:295-303.

Sunday, M.E., Kaplan, L.M., Motoyama, E., Chin, W.W., Spindel, E.R. (1988). Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab. Invest.*, 1989; 59: 5-23.

Stangelberger, A., Schally, A.V., Letsch, M., Szepeshazi, K., Nagy, A., Halmos, G., Kanashiro, C.A., Corey, E., Vessella, R. (2006). Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 inhibits growth of experimental human prostate cancers. **Int J Cancer**, 118:222-9.

Szepeshazi, K., Halmos, G., Schally, A.V., Arencibia, J.M., Groot, K., Vadillo-Buenfil, M., Rodriguez-Martin, E. (1999). 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.**, 25:444-52.

Szepeshazi, K., Schally, A.V., Cai, R.-Z., Radulovic, S., Milovanovic, S., Szoke, B. (1991). Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analogue RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. **Cancer Res.**, 51: 5980-5986.

Szepeshazi, K., Schally, A.V., Groot, K., Halmos, G. (1993). Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP)(14-27) and bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 on growth of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. **Int. J. Cancer**, 54: 282-289.

Szepeshazi, K., Schally, A.V., Halmos, G., Groot, K., Radulovic, S. (1992). Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen-independent MXT mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095. **J. Natl. Cancer Inst.**, 84: 1915-1922.

Szepeshazi, K., Schally, A.V., Nagy, A., Wagner, B.W., Bajo, A.M., Halmos, G. (2003). Preclinical evaluation of therapeutic effects of targeted cytotoxic analogs of somatostatin and bombesin on human gastric carcinomas. **Cancer**, 98:1401-10.

Szepeshazi, K., Schally, A.V., Nagy, A., Halmos, G. (2005). Inhibition of growth of experimental human and hamster pancreatic cancers in vivo by a targeted cytotoxic bombesin analog. **Pancreas**, 31:275-82.

Tatsuta, M., Lishi, H., Baba, M., Narahara, H., Uedo, N., Yano, H., Yamamoto, R., Mukai, M., Akedo, H. (2001). Induction by bombesin of peritoneal metastasis of gastric cancers induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Gastric Cancer.**, 4:14-9.

Thomas, S.M., Grandis, J.R., Wentzel, A.L., Gooding, W.E., Lui, V.W., Siegfried, J.M. (2005). Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. **Neoplasia**, 7:426-31.

Ullrich, A., Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell**, 61: 203-212.

Veale, D., Ashcroft, T., March, C., Gibson, G.J., Harris, A.L. (1987). Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. **Br. J. Cancer**, 55: 513-516.

Wada, E., Watase, K., Yamada, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Inomata, Y., Yamamoto, K., Sunday, M.E., Maeno, H., Mikoshiba, K., Ohki-Hamazaki, H., Wada, K. (1997). Generation and characterization of mice lacking gastrin-releasing peptide receptor. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 239: 28-33.

Wada, E., Way, J., Shapira, H., Kusano, K., Lebacqz-Verheyden, A.M., Coy, D., Jensen, R., Battery, J. (1991). cDNA cloning, characterization and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. **Neuron** 6: 421-430.

Wada, K., Wada, E., Watase, K., Yamada, K., Ohki-Hamazaki, H. (1998). Bombesin, obesity, and social behavior. **Molec. Psych.**, 3: 204-206.

Wang, Q.J., Knezetic, J.A., Schally, A.V., Pour, P.M., Adrian, T.E. (1996). Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. **Int. J. Cancer**, 68:528-534.

Westendorf, J., Schonbrun, A. (1983). Characterization of bombesin receptors in a rat pituitary cell line. **J. Biol. Chem.**, 258: 7527-7535.

Wharton, J., Polak, J.M., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Solcia, E., Brown, M.R., Pearse, A.G. (1978). Bombesin-like immunoreactivity in the lung. **Nature** 273: 769-770.

Willey, J.C., Lechner, J.F., Harris, C.C. (1984). Bombesin and the C-terminal tetrapeptide of gastrin releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. **Exp. Cell Res.**, 153: 245-248.

Xiao, D., Chinnappan, D., Pestell, R., Albanese, C., Weber, H.C. (2005). Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. **Cancer Res.**, 65:9934-42.

Yamada, K., Wada, E., Imaki, J., Ohki-Hamazaki, H., Wada, K. (1999). Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3-deficient) mice. **Physiol. Behavior**, 66: 863-867.

Yang, K., Ulich, T., Taylor, I., Cheng, L., Lewin, K.J. (1983). Pulmonary carcinoids. Immunohistochemical demonstration of brain-gut peptides. **Cancer**, 52: 819-823.

Yano, T., Pinski, J., Szepeshazi, K., Halmos, G., Radulovic, S., Groot, K., Schally, A.V. (1994). Inhibitory effect of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. **Cancer**, 73: 1229-1238.

Zachary, I., Woll, E., Rozengurt, E. (1987). A role from neuropeptides in the control of cell proliferation. **Dev. Biol.**, 124: 295-308.

Zhang, Q., Thomas S.M., Xi, S., Smithgall, T.E., Siegfried, J.M., Kamens, J., Gooding, W.E., Grandis, J.R. (2004). SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. **Cancer Res.**, 64:6166-73.

PARTE 4

ANEXOS

Anexo I – Avaliação de Resposta Tumoral pela OMS

Tipo de resposta	Descrição
Completa	Desaparecimento das lesões por pelo menos 4 semanas, com comprovação histopatológica de ausência de 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.

Critérios para avaliação das respostas tumorais.

Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE PARA 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 # 9715

Prezado Paciente:

Você recebeu o diagnóstico de um tumor maligno e seus médicos concluíram que seu tumor não pode ser removido através de uma cirurgia, mas acreditam que um tratamento com uma nova droga chamada “antagonista da bombesina (RC-3095)”, pode ajudá-lo. Portanto, gostaríamos de lhe oferecer este 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 destes animais, sendo estes testes muito importantes na escolha de uma droga que possa funcionar em tumores que também são encontrados em seres humanos.

Objetivo do estudo:

A pesquisa, para a qual você está sendo convidado(a) a participar, é um estudo que tem 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; e,
- 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 raios-X, tomografias e/ou ecografias.

Você pode já ter realizado alguns ou todos esses exames, mas em alguns momentos será necessário realizá-los novamente.

Semanalmente serão realizadas:

- uma consulta ambulatorial, para avaliação do seu estado físico geral; e
- 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 realização de hemograma, como já descrito acima, e bioquímica para avaliação do funcionamento dos rins e fígado.

Você receberá a droga RC-3095 para ser administrada na dose de _____ µg/kg através de uma injeção subcutânea, uma vez ao dia, durante todos os dias, por 3 semanas (1º ciclo). O tratamento continuará diariamente sem intervalos nos ciclos subseqüentes. É importante salientar que não foram observados efeitos colaterais no estudo realizado em animais, porém, apenas em alguns casos observou-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 estes 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 lhe acompanha) sobre quaisquer efeitos que surgirem para que sejam tomadas as devidas precauções quanto ao prosseguimento do seu tratamento.

No caso de qualquer dúvida, você poderá entrar em contato com:

Dr: _____ Telefone: _____

Enfermeira: _____ Telefone: (0xx 51 2101 8012)

Estudo de farmacocinética:

Nos pacientes que concordarem em participar deste estudo, uma amostra de sangue será coletado antes e outras logo após a administração do medicamento. Além das amostras de sangue, será coletada uma pequena amostra do tecido da pele.

Custo do tratamento:

Os pacientes tratados serão acompanhados conforme rotina de atendimento ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e não necessitarão arcar com nenhum ônus.

Proteção dos dados obtidos através do estudo:

Durante este tratamento, as informações obtidas através dos exames realizados serão comparados com as de outros pacientes no mesmo estudo, e utilizados para análise dos resultados do tratamento. Somente as informações serão utilizadas, sendo que o seu nome e informações pessoais não serão identificados, mantendo-se a confidencialidade. Solicitamos também que caso você concordar em participar deste estudo, assinasse o documento em anexo, de acordo com a resolução datada de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, o qual assegura a proteção dos pacientes envolvidos em pesquisa biomédica.

Eu, abaixo assinado, de nome _____

confirmando que fui informado pelo médico _____, quanto aos riscos, benefícios e possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes do tratamento.

Apresento, pois, meu livre consentimento para participar do estudo. Posso, a qualquer momento, optar por abster-me dele, sem motivo especial, e sem qualquer prejuízo aos cuidados que tenho 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; nome, sobrenome e posição com os dizeres “lido e aprovado” , escritos acima da mesma, à mão.

Anexo III – Escala de Desempenho Clínico do ECOG*

Grau	ECOG
0	Indivíduo completamente ativo e capaz de realizar sem restrições todas as atividades que realizava antes da doença
1	Indivíduo realiza atividades fisicamente extenuantes com restrições, porém deambulante e capaz de realizar tarefas leves ou de natureza sedentária, p. ex., tarefas domésticas leves, trabalho de escritório
2	Indivíduo deambulante por mais de 50% das horas em vigília e capaz de cuidar de si mesmo, porém incapaz de realizar atividades profissionais
3	Indivíduo com capacidade limitada a apenas cuidar de si mesmo, acamado ou sentado por mais de 50% das horas em vigília
4	Completamente incapaz. Não consegue cuidar de si mesmo, acamado ou sentado o tempo todo
5	Óbito

* Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P. (1982). Toxicity and Response Criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol; 5:649-655.

Anexo IV – Critério de Terminologia Comum para Sistema de Gradação de Eventos Adversos do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos - versão 3.0

Os critérios de terminologia comum de eventos adversos versão 3.0 são encontrados no *website* do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos no endereço: <http://ctep.cancer.gov/forms/CTCAEv3.pdf>.

Anexo V – Metodologia do Estudo de Novas Drogas Anticâncer*

As drogas anticâncer são, via de regra, desenvolvidas em várias etapas, que se iniciam com a identificação de um composto de interesse (aquisição) e a realização de estudos *in vitro* e em animais que possam estimar o seu potencial efeito antitumoral. Uma vez confirmado o interesse no novo composto, é iniciado o processo de elaboração de uma nova formulação farmacêutica adequada para o uso em seres humanos e a produção do composto em maior escala, de modo a viabilizar a realização de estudos toxicológicos e farmacológicos em animais.

Tabela 1. Principais etapas no desenvolvimento de novas drogas anticâncer.

Etapas pré-clínicas	Aquisição Testes de Atividade (triagem) In vitro In vivo Produção em maior escala Formulação Estudos toxicológicos/farmacológicos em animais
Etapas Clínicas	Estudos de fase I/ farmacocinéticas Estudos de fase II Estudos de fase III Estudos de fase IV

Uma vez definida a segurança do novo composto em modelos animais e uma dose recomendável para o início de estudos em seres humanos, passa-se à fase de estudos clínicos. Os estudos clínicos com novos compostos anticâncer envolvem várias etapas, denominadas estudos de fases I, II, III e IV.

Na fase I, estima-se principalmente o perfil de toxicidade do novo composto e é determinado um nível de dose seguro para estudos clínicos subseqüentes. Sempre que possível, são obtidas informações quanto ao comportamento farmacocinético do novo agente no homem e a ocorrência de

efeitos antitumorais. Nesta fase, pacientes com câncer recebem a droga experimental pela primeira vez ou uma nova combinação de drogas é estudada. Podem ser incluídos pacientes com diferentes tipos de câncer, desde que estejam em estádios avançados e em progressão clínica, e que já tenham sido tentadas as formas de tratamento convencional da doença.

O desenho padrão dos estudos de fase I utiliza grupos de inclusão consecutiva, a intervalos de pelo menos 1 semana, conteúdo de 3 a 5 pacientes por nível de dose, iniciando-se com uma dose baixa e segura definida em estudos toxicológicos em animais, que é escalonada em grupos subseqüentes de pacientes para doses mais elevadas, até que sejam definidas a dose máxima tolerável (DMT) e as toxicidades limitantes da dose (TLD).

A partir desse processo, identifica-se a dose recomendada para os estudos futuros de fase II. Em fase I, podem ser incluídos pacientes com ou sem tumor mensurável, uma vez que a determinação de atividade antitumoral não constitui o objetivo central desta fase de estudo.

Em fase II, a dose recomendada é estudada em grupos de pacientes com tumores específicos e que possuem tumores mensuráveis de forma objetiva. Com isto podem-se avaliar os índices de respostas tumorais objetivas do novo composto à luz dos efeitos adversos produzidos. As informações sobre a toxicidade também são um componente importante desses estudos. Os estudos de fase II são, via de regra, não-randomizados e com a inclusão de pacientes de forma consecutiva, utilizando-se regras estatísticas de modo a estimar o potencial do novo composto ou combinação a produzirem respostas tumorais objetivas com o menor número de pacientes possível.

Isto é fundamental para que não seja incluído um número excessivo de pacientes em estudos com drogas ineficazes. Observando-se atividade antitumoral significativa e/ou um perfil de toxicidade de interesse, a equipe poderá decidir por manter o desenvolvimento clínico deste composto ou

combinação, estender o número de estudos de fase II, com a inclusão com um maior número de pacientes; e após, prosseguir com estudos de fase III.

Os estudos de fase III têm como objetivo comparar o tratamento convencional utilizado em um tumor específico com uma nova substituição incluindo o novo composto ou combinação. Para tal, utiliza-se um desenho de estudo prospectivo e randomizado, no qual um número suficiente de pacientes é incluído no braço de tratamento convencional (grupo-controle), e este é comparado ao braço contendo o novo composto em adição ou substituição a uma das drogas utilizadas no esquema convencional.

Uma vez demonstrada vantagem em eficácia e/ou toxicidade com o braço experimental, esta experiência é estendida a um número maior de pacientes, através de estudos de fase IV. Nesta etapa, a eficácia do novo composto é avaliada em um número elevado de pacientes e com seguimento de longo tempo, via de regra, já durante sua fase de comercialização e uso em larga escala. Com isso, pode-se estimar com maior precisão o real valor do novo composto no contexto geral do tratamento, sobretudo em relação aos seus efeitos colaterais menos comuns ou dependentes de uma exposição prolongada.

Como pode ser depreendido das informações acima mencionadas, o processo de desenvolvimento de novas drogas anticâncer é muito complexo e requer uma conjunção de esforços, via de regra, disponível apenas em instituições acadêmicas e/ou científicas especializadas ou em laboratórios pertencentes à indústria farmacêutica. Na grande maioria das vezes, conjugam-se esforços do setor público e privado, tornando-se este um trabalho interdisciplinar, multi-institucional e de dimensão e logística de desenvolvimento internacional.

Este longo e detalhado processo de investigação clínica de um novo composto é fundamental na elaboração de protocolos de estudos clínicos. Nos países em que são desenvolvidas pesquisas clínicas desta natureza, deve ser seguida uma série de normas legais, éticas e científicas. No Brasil, por exemplo, todos os projetos de investigação clínica devem ser previamente submetidos à aprovação dos Comitês de Ética e Pesquisa das Instituições envolvidas e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Todo o protocolo de pesquisa deve estar de acordo com as Resoluções 196 e 251 do Ministério da Saúde que regulam as atividades de pesquisa na área de farmacologia no Brasil.

* Adaptado da Dissertação de Mestrado de Luciane Di Leone, UFRGS. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, Porto Alegre, BR-RS, 2000. Estudo de fase II com Topotecan em infusão contínua endovenosa em pacientes com adenocarcinoma de pâncreas: Correlação entre resultados de estudos pré-clínicos em linhagens tumorais humanas e resultados de avaliação farmacocinética em pacientes.

ANEXO VI - Estudos de toxicidade do RC-3095 em animais

Em cães Beagle

Nos laboratórios de Schally (Toxicology Report: data on file; Asta Laboratórios, Alemanha), 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 as administrações repetidas, diárias e subcutâneas 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 3 µg/Kg de peso como limite inferior (grupo 2), 5 µg/Kg de peso como dose média (grupo 3) e 10 µg/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 quatro na segunda semana e em duas fêmeas do grupo três (Nº 16,17), com dose média,

na segunda semana. Os locais das injeções subcutâneas estavam moderadamente edemaciadas devido às propriedades irritantes da substância testada. Nenhuma 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, dentição, 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 relacionadas 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 quatro 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 controles 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 em cães Beagle, que o teste da substância não induziu toxicidade específica em uma dose que variou de 3 e 10 µg/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.

Em ratos Wistar

Nos laboratórios de Schally (Toxicology Report: data on file; Asta Laboratórios, Alemanha), 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 SC 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 3 µg/Kg de peso como a menor dose (grupo 2), a 10 µg/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 achado relacionado 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 limitadas, 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 10 µg/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.

ANEXO VII

Artigo original

Publicado no J Chromatography B, 816:321-326, 2005.

Alberto S. Pereira, Luciane DiLeone, Fabiano H. Souza, Sergio Lilla, Marc Richter,
Gilberto Schwartzmann, Gilberto De Nuccia

Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide
antagonist RC-3095 by liquid chromatography–tandem
mass spectrometry

Short communication

Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Alberto S. Pereira^a, Luciane DiLeone^b, Fabiano H. Souza^b, Sergio Lilla^a, Marc Richter^b, Gilberto Schwartzmann^b, Gilberto De Nucci^{a,*}

^a Galeno Research Unit, Latino Coelho St., 1301, Parque Taquaral, 13087-010 Campinas, SP, Brazil

^b Postgraduate Course in Medicine and Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos St., 2350/399, 90003-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Received 7 April 2004; accepted 18 November 2004

Available online 29 December 2004

Abstract

Bombesin (BN) and its mammalian equivalent, gastrin-releasing peptide (GRP), stimulate cell proliferation and are involved in the pathogenesis of several types of human cancer. BN/GRP and their receptors were shown to be critical for the growth of various human malignancies, such as small-cell lung, prostate, ovary, stomach and breast cancers in the human tumor xenograft model. In the present study, a fast, sensitive, robust method was developed for the determination and quantification of a BN/GRP receptor antagonist RC-3095 (D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)Leu-NH₂), in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. RC-3095 was extracted from 0.2 ml human plasma by protein precipitation using cold acetonitrile (0.4 ml). The method has a chromatographic run of 10 min using a C₈ analytical column (150 mm × 4.6 mm i.d.) and the linear calibration curve over the range was linear from 20 to 10000 ng ml⁻¹ ($r^2 > 0.994$). The between-run precision, based on the relative standard deviation replicate quality controls, was 5.7% (60 ng ml⁻¹), 7.1% (600 ng ml⁻¹) and 6.8% (8000 ng ml⁻¹). The between-run accuracy was ±0.0, 2.1 and 3.1% for the above-mentioned concentrations, respectively. The developed procedure allows the quantitative determination of peptide RC-3095 for pharmacokinetics studies in human plasma.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: RC-3095; Bombesin antagonist; Peptide; Human plasma; Quantification

1. Introduction

Bombesin (BN) and its mammalian counterpart, gastrin releasing peptide (GRP) have a wide range of neuroendocrine activities [1–2], such as proliferation of several cell types. Chronic administration of BN/GRP increases the DNA content of gastric and colonic mucosa and induces hyperplasia of mucosal cells [2]. Different studies have shown that antagonists of BN/GRP inhibit the growth of various cancers by interfering with the growth-stimulatory effects of bombesin-like peptides, and reducing the levels of epidermal growth factor [3–4]. RC-3095 belongs to series of

BN/GRP receptor antagonists synthesized by Schally and co-workers [5], which was selected for clinical development due to its marked antitumor activity in experimental human malignancies in vivo and lack of significant side-effects in animal toxicology studies [6]. Little is known about the pharmacokinetics of BN antagonists. Several reports show that the half-time of BN-like peptides in circulation is very short. In rats the levels of a bombesin/GRP receptor antagonist [(D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)Leu-NH₂); Tpi = 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-3-carboxylic acid], RC-3095, declined rapidly after a single subcutaneous administration and became undetectable after 3–5 h [2]. The radioimmunoassay is often used for quantification of BN receptor antagonist RC-3095 in plasma. However, this approach is laborious and needs selective antibodies

* Corresponding author. Fax: +55 1932521516.

E-mail address: denucci@dglnet.com.br (G.D. Nucci).

against this peptide. Quantification of different drugs in biological matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) is becoming in common, due to the improved sensitivity and specificity of this technique [7]. Presently, RC-3095 is undergoing phase I clinical evaluation as a daily subcutaneous administration in patients with advanced refractory solid tumors. Considering that a previously described radioimmunoassay method for the measurement of bombesin/GRP antagonists proved to be inadequate for the measurements of RC-3095 in patient plasma samples [8], we have succeeded in developing a specific, sensitive and fast LC–MS–MS method for its quantification in human plasma. The procedure requires a simple protein precipitation and was developed for pharmacokinetics studies.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

BN receptor antagonist RC-3095 (99% of purity) was obtained from Zentaris (Frankfurt/Main, Germany). Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) while the formic acid, analytical grade was purchased from Merck (Rio de Janeiro, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Gradient Millipore system (São Paulo, Brazil). Blank blood was collected from healthy, drug-free volunteers. Plasma was obtained by centrifugation of blood treated with anticoagulant sodium heparin. Pooled plasma was prepared and stored at approximately -70°C until needed.

2.2. Calibration standards and quality controls

The stock solution of BN receptor antagonist RC-3095 was prepared in water at concentrations of 1 mg ml^{-1} . Calibration curves for BN receptor antagonist RC-3095 were prepared in blank human plasma at concentrations of 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 and $10,000\text{ ng ml}^{-1}$ and performed in duplicate in each batch. Quality control samples were prepared in blank plasma at concentrations of 60, 600 and 8000 ng ml^{-1} (QCA, QCB and QCC, respectively).

2.3. Sample preparation

Aliquots (0.20 ml) of human plasma were employed for a simple protein precipitation, 0.40 ml of cold acetonitrile were added and the samples were vortex mixed for 40 s, centrifuged at 3000 g during 1 min, the upper layer were transferred into glass microvials, capped and placed in an autosampler.

2.4. Liquid chromatography and mass spectrometry conditions

An HPLC system (Hewlett-Packard, Model 1100) consisting of a binary pump (G1312A) was used for all analysis.

Table 1
Conditions of mobile phase gradient

Time (min)	Mobile phase A (%) (water, 0.1% TFA)	Mobile phase B (%) (acetonitrile, 0.1% TFA)
0.0	90	10
0.1	90	10
3.0	50	50
8.5	30	70
9.5	90	10
10.0	90	10

The chromatographic system consisted of a C_8 Genesis analytical column ($100\text{ mm} \times 4.6\text{ mm id}$, $3\text{ }\mu\text{m}$ film thickness) and the mobile phase was composed of a mixture of solvent A [water (0.1% of TFA)] and B [acetonitrile (0.1% of TFA)] in a gradient as shown in Table 1. The total run time was set for 10 min at a flow rate of 1.0 ml min^{-1} . The column was operated at room temperature and present a void time of 1.0 min. The temperature of the autosampler (CTC Analytics, HTS PAL) was maintained at 6.5°C and was set up to make $40\text{ }\mu\text{L}$ sample injection. Mass spectrometry was performed in a Sciex API 4000 triple stage quadrupole mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API electrospray source operating in pos-

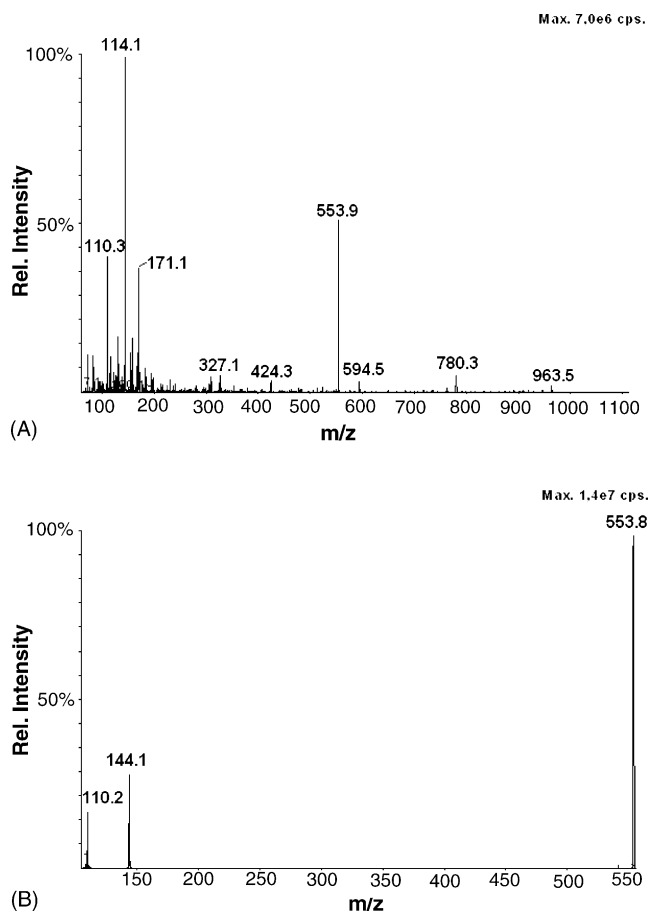


Fig. 1. Full-scan mass spectra (Q1) of the peptide RC-3095 (A) and their respective product ion spectra (B).

itive mode (ES⁺). The source block temperature was set at 450 °C and the electrospray capillary voltage to 5.5 kV, and nitrogen was used as a collision gas. The ions monitored in multiple reaction monitoring (MRM) in the conditions were declustering potential (DP)=31 V, collision energy (CE)=45 eV and collision exit potential (CXP)=10 V; MRM m/z 553.9 → 144.1, was used for quantitation of BN receptor antagonist RC-3095. Data were acquired by Analyst software (1.3.1, Applied Biosystems) and calibrations curves for the analyte were constructed using the RC-3095 peak-area via a weighted ($1/x^2$) least-squares linear regression. Unknown sample peak-areas were then interpolated from the

calibration curve to provide concentrations of BN receptor antagonist RC-3095.

2.5. Recovery

Preliminary experiments were conducted to evaluate the recovery with the extraction method described above. The percentage recovery was calculated as the ratio of the peak area for extracted blank plasma spiked at each standard concentration (60, 600 and 8000 ng ml⁻¹) relative to peak area of the equivalent blank plasma samples spiked after the extraction.

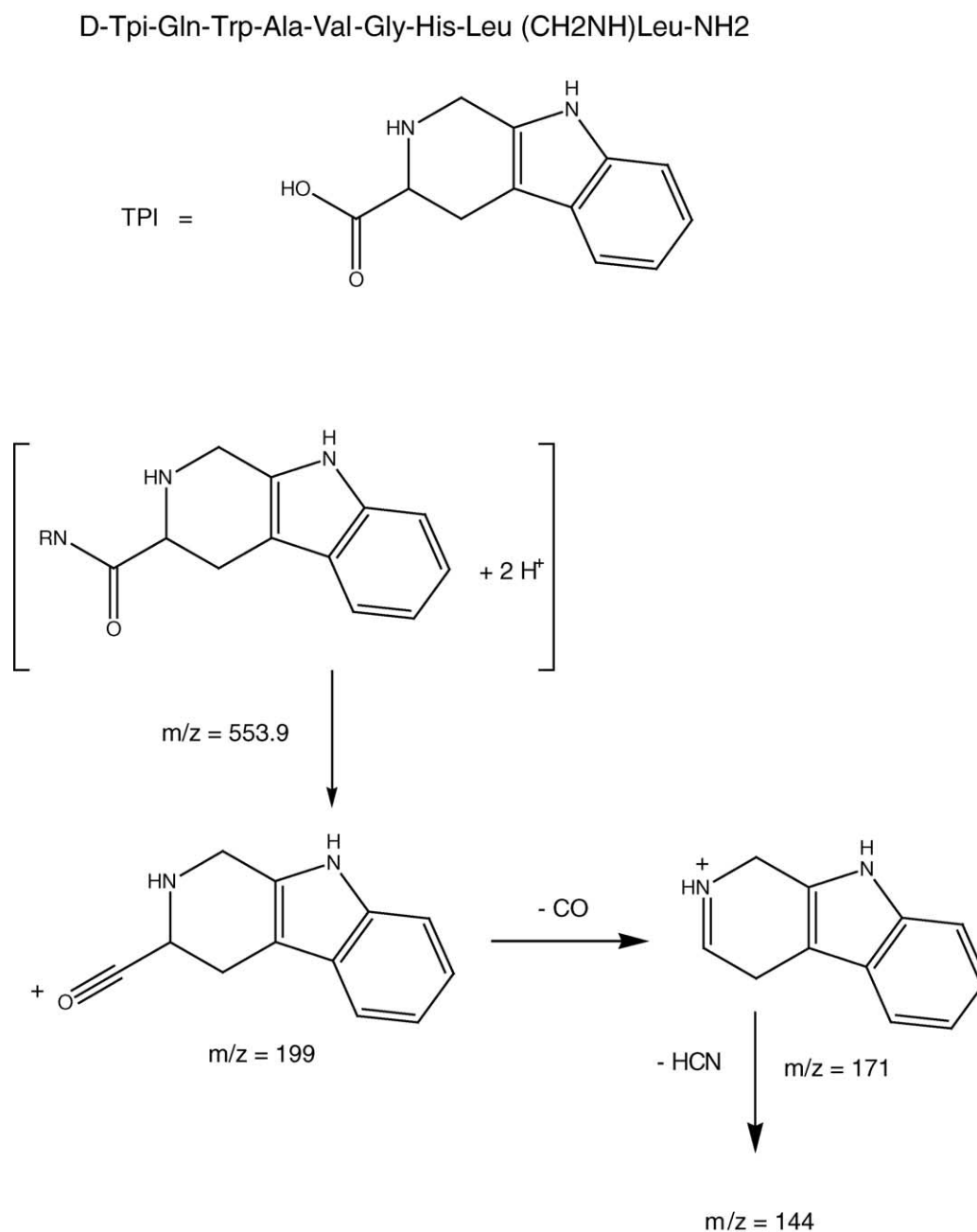


Fig. 2. Proposed mass fragmentation pathways for the peptide RC-3095.

2.6. Assessment of ion suppression

To assess the effect of ion suppression on the MS–MS signal of the analyte, RC-3095, the extraction procedure described above was evaluated. The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a “zero volume tee” before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of RC-3095. The infusion pump was set to transfer (10 $\mu\text{l}/\text{min}$) of the analyte in water (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2.7. Stability

Quality control samples prepared to test stability (60, 600 and 8000 ng ml^{-1}) were subjected to short-term (6 h) room temperature, three freeze–thaw cycles and 24 h autosampler (8 $^{\circ}\text{C}$) stability tests. Subsequently the peptide RC-3095 concentrations were measured in comparison with freshly prepared samples.

2.8. Precision and accuracy

The within- and between-run precision were determined as the relative standard deviation, $\text{R.S.D.}(\%) = 100(\text{S.D.}/M)$ and the accuracy as the percentage relative error, $\text{RE}(\%) = (E - T) (100/T)$, where M is the mean, S.D. is the standard deviation of M , E is the experimentally determined concentration and T is the theoretical concentration.

3. Results and discussion

3.1. Method development

Electrospray positive mass spectrum for BN receptor antagonist RC-3095 showed the ion m/z 144 as the base peak, other intense ion is the m/z 553.9 [(with relative intensity of 55%), molecular ion with two H^+] (Fig. 1A). The transition m/z 553.9–144.1 was the most intense transition observed in the MS–MS spectrum (Fig. 1B). The ion m/z 144.1 is produced by fragmentation of the Tpi group (2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-3-carboxylic acid) (Fig. 2). Due to high intensity of the m/z 553.9 \rightarrow 144.1 reaction and not detectable interference in blank human plasma samples this transition was used in the present method.

The limit of quantification (LOQ) was validated for 20 ng ml^{-1} and with a run time of less than 10.0 min. The mass chromatograms of a blank and LOQ samples are shown in Fig. 3, in which the retention time of RC-3095 was 4.9 min. No internal standard was used, since the preparation of the sample needs only a protein precipitation step.

In this system no was observed a ion suppression of the MS signal at the time where the analyte is eluted (Fig. 3C).

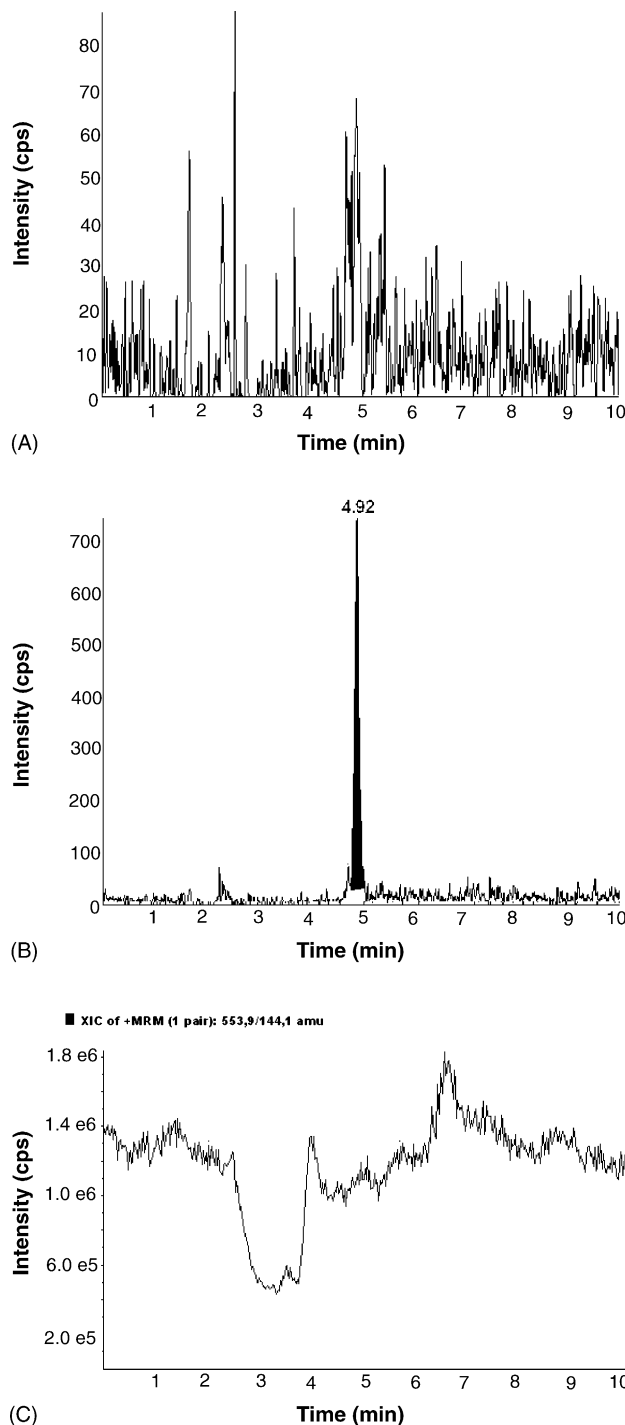


Fig. 3. MRM chromatogram for the peptide RC-3095 (A) of blank pooled human plasma, (B) of the peptide RC-3095 spiked in human plasma at a final concentration of 20 ng ml^{-1} and (C) the suppression ionic test for RC-3095 (infusion 10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ of a RC-3095 solution at 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in water).

3.2. Assay performance

The optimized method was validated by assessment of recovery, linearity, quantitation limit, precision and accuracy. Coefficients of variation and relative errors of less than 15% were considered acceptable, except for the quantitation

Table 2
Calibration curve of validation data for RC-3095

Expected value (ng/mL)	Validation curve results			Mean	Accuracy (%)	CV (%)
	Back concentration (ng/mL)	Back concentration (ng/mL)	Back concentration (ng/mL)			
20	18.9	19.1	20.2	19.4	97.0	3.6
	18.9	18.2	17.5	18.2	91.0	3.8
50	52.4	54	57.6	54.7	109.3	4.9
	56.9	57.6	50.9	55.1	110.3	6.7
100	109	107	106	107	107.3	1.4
	109	112	117	113	112.7	3.6
200	104	198	190	164	82.0	31.8
	105	206	207	173	86.3	33.9
500	484	514	504	501	100.1	3.1
	491	530	537	519	103.9	4.8
1000	1050	988	1060	1030	103.3	3.8
	1060	1010	1040	1040	103.7	2.4
2000	959	1960	1750	1560	77.8	33.9
	1010	2010	1910	1640	82.2	33.5
5000	4620	4700	4850	4720	94.5	2.5
	4770	4730	4830	4780	95.5	1.1
10000	9470	8630	8840	8980	89.8	4.9
	8520	8730	9040	8760	87.6	3.0
Correlation coefficient	0.9951	0.9990	0.9989			

limit (LOQ), whose values were extended to 20%, as recommended by Shah et al. [9] and Bressole et al. [10] for the analysis of biological samples for pharmacokinetics studies. The method was linear for the peptide from 20 to 10,000 ng ml⁻¹ ($r^2 > 0.9970$) on repeated calibration curves, specific data as a mean of three calibrations curves are presented on the Table 2.

The recovery of RC-3095, calculated from the peak area ratios of extracted human plasma previously spiked at final concentrations of 60, 600 and 8000 ng ml⁻¹ ($n = 15$ for each concentration) were 72.8, 89.7 and 87.4%, respectively.

Between- and within-run accuracy and precision for the quality controls are summarized in Table 3. In order to detect possible interferences in different plasma samples, the blank plasma samples of the 100 healthy volunteers were analyzed and in all cases, no peaks higher than 1/6 of the LOQ peak were observed. The result of these analysis was used to cal-

culate the decision limit [11] of the present method ($CC\alpha$, mean of the response obtained in 100 blank human plasma samples plus 2.33 S.D.) that was 3.6 ng ml⁻¹. The method offers advantages over those previously reported, in terms of a simple sample extraction and a faster run time (10 min).

BN/GRP and their receptors were showed to be critical for the growth of various human malignancies, such as small-cell lung, prostate, ovary, stomach and breast cancers in the human tumor xenograft model [12,13]. This autocrine stimulatory pathway has a direct effect on tumor cell proliferation and can be inhibited by a specific BN/GRP receptor antagonists [14]. Notably, the BN/GRP synthetic antagonist RC-3095 was devoid of any significant toxicity in tumor-bearing mice, at the doses in which tumor regressions were observed. For that reason, RC-3095 was selected as the first of a series of synthetic BN-GRP receptor antagonists to enter

Table 3
Validations with the quality controls (QC) having the results of the accuracy and precision of the peptide RC-3095

Parameter	Nominal concentration (ng ml ⁻¹)			
	20	60	600	8000
Intra-batch				
Mean found ($n = 8$) (ng ml ⁻¹)	21.6	66.3	537	7585
Accuracy (%)	7.7	2.5	1.6	2.2
Precision (%)	108.0	110.5	89.5	94.8
Inter-batch				
Mean found ($n = 3$) (ng ml ⁻¹)	21.1	67.5	585	7603
Accuracy (%)	3.8	1.4	5.8	3.5
Precision (%)	105.5	112.5	97.5	95.0

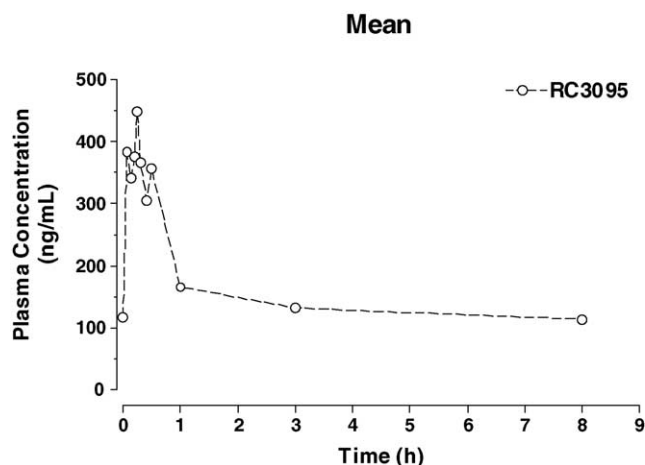


Fig. 4. Mean plasma levels of RC-3095 following subcutaneous administration to two cancer patients (8–96 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

human trials. Up to now, thirty patients with various types of advanced refractory malignancies received RC-3095 as part of a phase I clinical and pharmacokinetic study in which the drug was given to patients as a daily subcutaneous injection at doses ranging from 8 to 96 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Evidence of tumor activity was documented in patients with advanced hormone-refractory prostatic and medullary carcinoma of the thyroid. Plasma was obtained from patients included in the study immediately prior and after RC-3095 administration at various time-points; preliminary results of two patients are showed in Fig. 4.

4. Conclusions

A LC–MS–MS method for the quantification of the peptide RC-3095 in human plasma was developed and validated. This method offers advantages over those previously

reported, in terms of a simple sample extraction (protein precipitation without clean-up procedures) and a faster run time (10 min). The LOQ of 20 ng ml^{-1} is sufficient for the pharmacokinetics studies (the estimate $\text{LOQ}/C_{\text{max}} < 3\%$) and could be further improved by sample concentration if required. The assay performance results indicate that the method is precise and accurate enough for the routine determination of the peptide RC-3095 in human plasma.

References

- [1] F. Thomas, C. Mormont, B. Morgan, *Drugs Future* 19 (1994) 349.
- [2] K. Szepeshazi, A.V. Schally, G. Halmos, N. Lamharzi, K. Groot, J.E. Horvath, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 10913.
- [3] A.V. Schally, A.M. Comaru-Schally, A. Nagry, M. Kovacs, K. Szepeshazi, A. Plonowski, J.L. Varga, G. Halmos, *G. Front. Neuroendocrinol* 22 (2001) 248.
- [4] A.M. Bajo, A.V. Schally, K. Groot, K. Szepeshazi, *Br. J. Cancer* 90 (2004) 245.
- [5] Y. Qin, T. Ertl, R.Z. Cai, G. Halmos, A.V. Schally, *Cancer Res.* 54 (1994) 1035.
- [6] J. Pinski, A.V. Schally, G. Halmos, K. Szepeshazi, K. Groot, *Cancer Res.* 54 (1994) 5895.
- [7] R. Kostianien, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 357.
- [8] K. Groot, J.E. Horvath, R.Z. Cai, A.V. Schally, *Int. J. Pept. Protein Res.* 45 (1995) 561.
- [9] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilvery, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layoff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pitman, *S. Spector. Pharm. Res.* 9 (1992) 588.
- [10] F. Bressolle, M.B. Petit, M. Audran, *J. Chromatogr. B* 686 (1996) 3.
- [11] COMMISSION DECISION (EC) 2002/657, *Off. J. Europ. Communities* L221 (2002) 8.
- [12] A.M. Bajo, A.V. Schally, M. Krupa, F. Herbert, K. Groot, K. Szepeshazi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 3836.
- [13] H. Reile, P.E. Armatis, A.V. Schally, *Prostate* 25 (1994) 29.
- [14] G. Halmos, J. Pinski, B. Szoke, A.V. Schally, *Cancer Lett.* 85 (1994) 111.

ANEXO VIII

Artigo original

Publicado no Invest New Drugs 24:403-12, 2006

**G. Schwartzmann, L. P. DiLeone, M. Horowitz, D. Schunemann, A. Cancelli, A. S. Pereira,
M. Richter, F. Souza, A. Brondani da Rocha, F. H. Souza, P. Pohlmann, G. De Nucci**

**A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing
peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients
with advanced solid malignancies**

A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies

G. Schwartzmann · L. P. DiLeone · M. Horowitz ·
D. Schunemann · A. Cancelli · A. S. Pereira ·
M. Richter · F. Souza · A. Brondani da Rocha ·
F. H. Souza · P. Pohlmann · G. De Nucci

Published online: 24 February 2006
© Springer Science + Business Media, LLC 2006

Summary Bombesin/gastrin-releasing peptides (BN/GRP) were shown to bind selectively to cell surface receptors, stimulating the growth of various types of malignancies in murine and human models. The novel BN/GRP synthetic receptor antagonist, RC-3095, was able to produce long-lasting tumor regressions in murine and human tumor models *in vitro* and *in vivo*. Animal toxicology studies showed no detectable organ toxicity apart from local irritation at the injection site. The purpose of this study was to determine the safety and feasibility of the administration of RC-3095 by daily subcutaneous injections in patients with advanced and refractory solid malignancies. Twenty-five patients received RC-3095 once or twice-daily at doses ranging from 8 to 96 ug/kg.

Dose was escalated in groups of 3–5 patients per dose level. The only toxicity observed was local discomfort in the injection site at the highest doses. A single dose administration of RC-3095 at the highest dose level (96 ug/kg) was tested in a clearly hypergastrinemic individual with the Zollinger-Ellison syndrome and produced a decrease in plasma gastrin down to 50% of basal levels in 6 h. There was no objective tumor responses in patients included in the study. A short-lasting minor tumor response was observed in a patient with a GRP-expressing progressive medullary carcinoma of the thyroid. Due to problems with the analytical method, plasma pharmacokinetic data was obtained only from two patients included at the highest dose level. In these patients, RC-3095 reached plasma concentrations >100 ng/mL for about 8 h, which were within therapeutic levels on the basis of prior data obtained in mice and rats. The plasma elimination half-life was between 8.6–10.9 h. Due to the occurrence of local toxicity at the injection site, the dose escalation procedure could not be fully evaluated up to a maximum tolerated dose. Thus, a recommended dose of RC-3095 for Phase II trials could not be clearly established. Considering the novelty of its mechanism of action and impressive preclinical anti-tumor activity, further studies exploiting new formulations of RC-3095 for human use, such as slow-release preparations, and analogues with a more favorable pharmacokinetics are warranted.

G. Schwartzmann · L. P. DiLeone · A. Cancelli · P. Pohlmann
South-American Office for Anticancer Drug Development
(SOAD),
Porto Alegre, Brazil

G. Schwartzmann · L. P. DiLeone · M. Horowitz · F. Souza ·
F. H. Souza · P. Pohlmann
Postgraduate Course in Medicine, Academic Hospital, Federal
University of Rio Grande do Sul (UFRGS),
Porto Alegre, Brazil

D. Schunemann · M. Richter · A. B. da Rocha
Lutheran University of Brazil,
Porto Alegre, Brazil

A. S. Pereira · G. De Nucci
Galeno Research Unit,
Campinas, Brazil

G. Schwartzmann (✉)
Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos 2350/sala 399, Porto Alegre—RS, Brazil,
CP 90035903
e-mail: gschwartzmann@hcpa.ufrgs.br

Keywords Bombesin/GRP antagonists · RC-3095 · Phase I trial · Solid tumors

Introduction

Bombesin (BN) is a 14-amino acid peptide isolated from frog skin [1]. Studies using amphibian BN antibodies

revealed the presence of BN-like immunoreactivity in mammalian gut, CNS and lung. BN-like peptides have been also characterized, including the gastrin-releasing peptide (GRP) and neuromedin B. Furthermore, three mammalian BN-like receptors have been cloned: GRP/BN-preferring receptor, neuromedin B receptor and the orphan BN receptor subtype 3. These receptors are seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors that are able to stimulate various intracellular signaling pathways [1].

BN/GRP were shown to be involved in several neuroendocrine pathways. BN and GRP stimulate the secretion of gastrin, somatostatin and pancreatic juice. BN-like peptides stimulate smooth muscle contraction in the urinary bladder, uterus, gall-bladder and stomach. Cell surface receptors for BN/GRP were also demonstrated in neuronal elements of the myoenteric plexus and in the nervous system as well as to stimulate cell proliferation in a variety of experimental models, such as Swiss 3T3 fibroblasts, fetal lung cells, digestive tract and pancreatic cells [1].

BN/GRP receptors play also a role in the development and progression of various murine and human tumors [2–4]. GRP receptors have been demonstrated in small cell carcinoma lines, and GRP was shown to bind to these cell surface receptors, acting as an autocrine stimulus for the growth of these tumors [2–5]. The involvement of BN/GRP in the growth of other tumors, such as gastric, pancreatic, colon, breast and prostate cancer was also described [6–8].

On the basis of the observation of growth stimulatory effects of BN-like peptides in several solid malignancies in preclinical models, a series of BN/GRP antagonists have been synthesized and evaluated in experimental tumor systems [9, 10]. The pseudonapeptide BN/GRP receptor antagonist [*D*-Tpi⁶, Leu¹³, psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] (RC-3095) and other antagonists were shown to possess a marked growth-inhibitory effect in MTX mouse mammary cancers, Dunning rat prostate cancer and nitrosamine-induced pancreatic cancer in hamsters, as well as in human tumors such as SW-1990 pancreatic cancer, MCF-7MIII breast cancer, MKN-45 gastric tumors, HT-29 colon cancer PC-3 prostate cancer and various SCLC implanted in nude mice [11–15]. In the above *in vivo* experiments, RC-3095 was administered by osmotic pumps (releasing 20–60 µg per day) or via subcutaneous daily administration (at the dose of 20 µg once-daily) [16–18].

In pharmacokinetic studies in mice, the highest plasma RC-3095 levels peaked at 2 min after intravenous injection (7.7 µg/ml). At 1 h, the levels dropped to 41 ng/ml and continued to decrease thereafter. Following subcutaneous administration, RC-3095 plasma levels peaked at 15 min (271 ng/ml) and dropped to 10 ng/ml at 3 h, becoming undetectable 5 h after drug administration. As the plasma half-life of RC-3095 was short in rats and mice, reaching undetectable plasma levels about 3 h following drug administration, the

maintenance of a steady tumor growth inhibition appeared to be dependent on the activation by RC-3095 of other relevant growth-stimulatory effects, such as the EGFR signaling pathways [19].

Notably, a murine anti-BN monoclonal antibody, 2A11, was able to inhibit tumor growth in human small cell carcinoma cell lines *in vitro* and was tested in a pilot clinical trial in patients with advanced small cell lung carcinoma producing antitumor effects [9]. For logistical reasons, this antibody was not studied further. Since then, various synthetic BN/GRP antagonists have been developed as potential experimental anticancer agents [10, 11].

RC-3095 is a selective BN/GRP-like antagonist bombesin [6–14] synthesized by Schally and cols. [12], which was shown to produce significant tumor regressions in various experimental tumors, including small cell lung, pancreatic, breast, prostatic, gastric and ovarian cancer cell lines implanted in nude mice [13, 14]. Subcutaneous administration of RC-3095 at daily doses between 10–20 µg/animal was associated with marked tumor regressions, including complete responses, with no significant treatment-related toxic effects [15, 16].

It was also shown that RC-3095 inhibited the growth of human breast cancer cells by interfering with the growth-stimulatory effects of BN-like peptides, reducing the expression of mRNA and protein levels of the epidermal growth factor receptor-2 (ErbB-2/HER-2) [17]. In addition, the inhibition of tumor growth by RC-3095 was associated with a significant reduction in tumor vascular volume and mRNA expression and protein levels of VEGF-A, bFGF and IGF-II [18, 19].

Animal toxicology tests were performed in Wistar rats and Beagle dogs, using a daily subcutaneous of RC-3095 in a water-manitol solution. In rats, groups of animals were exposed to RC-3095 for 4 consecutive weeks at doses ranging from 0.3–10 µg/kg, with no detectable toxicity. Studies performed in dogs, using RC-3095 for 2 consecutive weeks at the same dose range confirmed the lack of toxic effects of this compound. The only adverse effect that could be attributed to RC-3095 was local pain and erythema in the injection site at the highest doses. In fact, due to its poor solubility at increasing drug concentrations and the limitations in the volume of injection, the determination of a lethal or toxic dose of RC-3085 in animals, from which to derive a starting dose for human trials, was not possible.

Considering its novel mechanism of action, the lack of toxic effects and marked antitumor activity tumor-bearing animals, we have decided to initiate a Phase I and plasma pharmacokinetic study of RC-3095 in patients with advanced and refractory solid malignancies. The starting dose of RC-3095 was 8 µg/kg given by daily subcutaneous administration, which was derived from the dose level in which safety and antitumor activity was observed in

mice. Considering that the BN-related gastrin-releasing peptide (GRP) shows almost 100% homology with BN in the C-terminal 10 residues (Figure 1), we tried to use the effects of RC-3095 administration on plasma gastrin levels as a surrogate marker of its biological effects. Plasma EGF, VEGF, IGF and FGF levels were measured in plasma and normal skin in some patients, while GRP receptors were studied in selected tumor samples.

Patients and methods

This study was conducted under the framework of the South-American Office for Anticancer Drug Development (SOAD), Porto Alegre, Brazil. Drug supply was a limiting factor for the conduct of this study, causing its temporary discontinuation. All patients included in the study signed a written informed consent. The study was approved by the institutional review board (IRB) of the Academic Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and was conducted in accordance with the principles of good clinical practice (GCP). The study protocol was also approved by the Ministry of Health of Brazil.

Patient characteristics

Patients eligible for the study were adults between 18–75 years old, with histopathologically confirmed diagnosis of advanced and progressive solid tumors, not amenable to treatment by existing therapeutic modalities. Patients had to have a WHO performance status of 0–3, no concomitant infections or other active disease, adequate liver, kidney and cardiac function and a life expectancy of at least three months. They had to have a treatment-free

interval of at least 3 weeks from prior cytotoxic therapy (6 weeks for mitomycin C or nitrosoureas) and 4 weeks from prior irradiation. Patients with CNS metastasis, pregnant and breast-feeding women were not eligible for the study. Similarly, patients with previous or concurrent malignancies other than adequately treated skin cancer and in situ cervical carcinoma were also excluded from the study.

Patient evaluation

Pretreatment evaluation included a complete medical history and physical examination, complete biochemical and hematological evaluation, urinalysis, chest X-ray and/or CT scans for the bi-dimensional tumor evaluation (whenever possible). Blood counts and biochemistry were repeated weekly for the duration of the study. Toxicity was evaluated weekly and recorded after each cycle (21 days) according to the US National Cancer Institute Common Toxicity Criteria. The evaluation of tumor responses was based on the standard WHO criteria.

Prior to each treatment cycle, the dimensions of the marker tumor lesions were determined and a complete blood count and biochemistry was obtained. Tumor response was assessed after each course by measurements of the two largest diameters. A complete response was defined as the complete disappearance of all lesions for at least 4 weeks. Partial response was a reduction of at least 50% in the product of the perpendicular diameters of the lesions for at least 4 weeks. Minor response was a reduction of less than 50% in the product of the perpendicular diameters of the lesions. Disease without progression for at least 4 weeks was designated as stable disease. An increase of at least 25% in the product of two perpendicular diameters of the lesions was classified as disease progression.

Fig. 1 Known bombesin-related peptides

Known Bombesin-Related Peptides

Bombesin	p-EQRL	GNQWAVGHLM-NH ₂
Human GRP	VPLPAGGGTVLTKMYPR	GNHWAVGHLM-NH ₂
Human NMB	APLSWDLPEPRSRASKIRVHSR	GNLWATGHFM-NH ₂
Human NMC-10		GNHWAVGHLM-NH ₂

Structures of BN and BN-related peptides GRP, NMB and NMC. M-NH₂ is the amidated C-terminal methionine and p-E is the abbreviation for pyroglutamate. The C-terminal part of BN and BN-related peptides with high homology is boxed.

Drug administration

RC-3095 was manufactured by Zentaris AG (Frankfurt am Main, Germany) in the form of acetate salt. The powder was reconstituted in 4 mL sterile water to a final concentration of 2.0 mg/mL. The maximum volume of injection was 3 mL. The pharmacists provided the exact daily dose of RC-3095 to the patients. Prior to the first drug administration, the patient was instructed by a research nurse to keep the solution in the refrigerator until drug administration and to inject RC-3095 subcutaneously according to the protocol. The nurse also instructed the patients to rotate the site of injection, reviewing the injection sites for the presence of skin reaction on a weekly basis.

Dose escalation

The starting dose of RC-3095 had to be given once daily subcutaneously for 21 days to 3 consecutive patients in the first dose level, having at least one week interval between the start of drug administration in the patients. In case no toxicity was observed, patients were maintained at that dose level until disease progression. RC-3095 was then escalated according to a modified Fibonacci scheme in another group of 3–5 patients, and then successively, until a dose level that could be recommended for further trials was reached. Inpatient dose escalation was not allowed. Plasma gastrin levels were measured at each dose escalation level and studied as a potential surrogate marker of RC-3095 biological effects, to guide us in the definition of a suitable dose to be recommended for further studies. Similarly, skin biopsies were analyzed in some patients prior to and following RC-3095 administration for the study of its effects on the expression of various growth factors.

Pharmacokinetic study and liquid chromatography and mass spectrometry conditions

Initial attempts to detect RC-3095 in plasma of patients included in our study were unsuccessful due to problems with the available analytical method. Later on, a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed [20]. RC-3095 was extracted from 0.2 mL human plasma by protein precipitation using cold acetonitrile (0.4 mL). The method has a chromatographic run of 10 min using a C₈ analytical column (150 mm × 4.6 mm i.d.) and the linear calibration curve over the range was linear from 20 to 10000 ng mL⁻¹ ($r^2 > 0.994$). The between-run precision, based on the relative standard deviation replicate quality controls, was 5.7% (60 ng mL⁻¹), 7.1% (600 ng mL⁻¹) and 6.8% (8000 ng mL⁻¹). The between-run accuracy was ± 0.0, 2.1 and 3.1% for the above-mentioned concentrations, respectively.

For the measurement of RC-3095 plasma concentrations, blood was possible to be collected only from two patients included at the highest dose level, immediately before and at several time-points (1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h) after the first drug administration. Each sample was immediately centrifuged for 10 min at 3000 rpm and the plasma was divided in 2 mL aliquots. An HPLC system (Hewlett-Packard, Model 1100) consisting of a binary pump (G1312A) was used for all analysis. The chromatographic system consisted of a C₈ Genesis analytical column (100 mm × 4.6 mm id, 3 μm film thickness) and the mobile phase was composed of a mixture of solvent A [water (0.1% of TFA)] and B [acetonitrile (0.1% of TFA)]. The total run time was set for 10 min at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The column was operated at room temperature and presented a void time of 1.0 min. The temperature of the autosampler (CTC Analytics, HTS PAL) was maintained at 6.5°C and was set up to make 40 μL sample injection.

Mass spectrometry was performed in a Sciex API 4000 triple stage quadrupole mass spectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an API electrospray source operating in positive mode (ES+). The source block temperature was set at 450°C and the electrospray capillary voltage to 5.5 kV, and nitrogen was used as a collision gas. The ions monitored in Multiple Reaction Monitoring (MRM) in the conditions were declustering potential (DP) = 31 V, collision energy (CE) = 45 eV and collision exit potential (CXP) = 10 V; MRM m/z 553.9 → 144.1, was used for quantitation of BN receptor antagonist RC-3095. Data were acquired by Analyst software (1.3.1, Applied Biosystems) and calibration curves for the analysis were constructed using the RC-3095 peak-area via a weighted (1/x²) least-squares linear regression. Unknown sample peak-areas were then interpolated from the calibration curve to provide concentrations of BN receptor antagonist RC-3095.

Plasma gastrin levels

Plasma gastrin levels were measured in patients prior to RC-3095 administration and at various time-points thereafter. The samples were analyzed by a standard radio-immunoassay (RIE) using a commercial kit produced by Diasorin, MN, USA and purchased from Genese, Sao Paulo, Brazil.

Immunohistochemical technique

Five-μm-thick sections were mounted on organosilane-coated slides and dried overnight at 37°C. Sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded alcohols, and washed with distilled water. Then the sections were treated for antigen retrieval using citrate (10 mM, pH 6.0) for 20 min at boiling temperature, followed by 20 min cool-down in citrate buffer at room temperature. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 3% hydrogen

peroxide solution. After washing in PBS, slides were incubated for 20 min in protein block serum-free (Dako, Carpinteria, CA, USA).

The slides were washed in PBS, the respective primary antibodies (EGFr, VGFr, Ki67, gastrin release peptide (GRP)) (Dako, Carpinteria, CA, USA) was applied, and the tissue incubated for 30 min at 37°C and overnight at 4°C in a humidity chamber. After washing again in PBS, the tissues were incubated with biotinylated secondary antibody (Dako) for 30 min.

After washing in PBS, the slides were incubated with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (Dako) for 30 min and washed again in PBS buffer. Incubating slides with DAB Substrate-Chromogen System (Merck, WS, NJ, USA) identified bound antibody. After a final wash in PBS and distilled water, the slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded alcohol, cleared with xylene, and mounted with xylene-based permanent mounting medium.

Results

A total of 25 patients were included in the study, being 13 males and 12 females. The median age was 59 years (range, 32–80), with a median ECOG performance status of 1 (0–2) and the following tumor types: Prostate [6], breast [3], kidney [3], soft-tissue sarcoma [2], small-cell lung [2], colorectal [2], pancreas [2] and and others [5]. Prior therapy included surgery [12], chemotherapy [16], radiotherapy [6], hormone therapy [4] and immunotherapy [1]. The median number of cycles was 3 [1–5]. These characteristics are summarized in Table 1.

The dose of RC-3095 was escalated in different groups of patients as summarized in Table 2. The starting dose of RC-3095 was 8 ug/kg administered subcutaneously once a daily. This dose level was applied to 3 patients, who received a median of 4 courses each [2–5]. No detectable toxicity was documented in this group of patients, and the dose was escalated by 100% to 16 ug/kg in 3 patients, who received a median of 2 courses [1–3]. Again, no detectable toxicity was observed at this dose level. For that reason, the dose was escalated by 100% to 32 ug/kg once-daily in following 3 patients, and a median of 1 [1–3] courses was given to the patients. Once again, no adverse effects were documented.

By that time, data became available from Schally and cols., suggesting that a twice-daily drug administration could produce a more pronounced down-regulation of EGF receptors in tumor-bearing mice (A.V. Schally, personal communication). For that reason, we decided to amend the protocol to study the tolerability of the administration of RC-3095 twice-daily. Thus, a group of 3 patients was studied at the twice-daily 32 ug/kg dose level. The patients received each

Table 1 Characteristics of patients included in the phase I trial of RC-3095

Characteristics	Number of patients	(%)
Sex		
Male	13	(52)
Female	12	(48)
Age, years		
Median	59	
Range	32–80	
Performance Status (ECOG)		
Median	1	
Range	0–2	
Tumor type		
Prostate	6	(24)
Breast	3	(12)
Kidney	3	(12)
Soft-tisse sarcoma	2	(8)
SCL	2	(8)
Colorectal	2	(8)
Pancreas	2	(8)
NSCL	1	(4)
Thyroid	1	(4)
Esophagus	1	(4)
Stomach	1	(4)
Ovary	1	(4)
Prior therapy		
Surgery	12	(48)
Radiation therapy	6	(24)
Chemotherapy	16	(64)
Hormone therapy	4	(16)
Immunotherapy	1	(4)
Median courses/patient	3 (1–5)	

Table 2 Dose escalation steps applied in the phase I trial of RC-3095

Dose level	RC-3095* (ug/kg)	Number of patients
I	8 daily	3
II	16 daily	3
III	32 daily	3
IV	32 twice-daily	3
V	48 twice-daily	3
VI	96 twice-daily	3
VII	96 once-daily	7

*RC-3095 was administered daily by subcutaneous injection.

one course of RC-3095 and no systemic toxicity was observed. However, local discomfort at the injection site was documented in one patient.

The dose was then escalated to twice-daily 48 ug/kg in 3 patients, who received a median of 3 [1–6] courses of RC-3095, with mild discomfort at the injection site in 2 out of the 3 patients. Another dose escalation step included initially 2 patients at the twice-daily 96 ug/kg and a median of 1 [1, 2] courses were administered. Again, no significant systemic toxicity was documented in these two dose

Table 3 Incidence of drug-related toxicities by CTC Grade in patients included in the phase I trial of RC-3095

Type	CTC Grade			
	1 Pts (%)	2 Pts (%)	3 Pts (%)	4 Pts (%)
Local pain/Induration	5 (20)	–	–	–
Rash	1 (4)	–	–	–
Fatigue	–	–	–	–
Nausea	1 (4)	–	–	–
Vomiting	–	–	–	–
Diarrhea	–	–	–	–
Mucositis	–	–	–	–
Anemia	–	–	–	–
Leucopenia	–	–	–	–
Thrombocytopenia	–	–	–	–

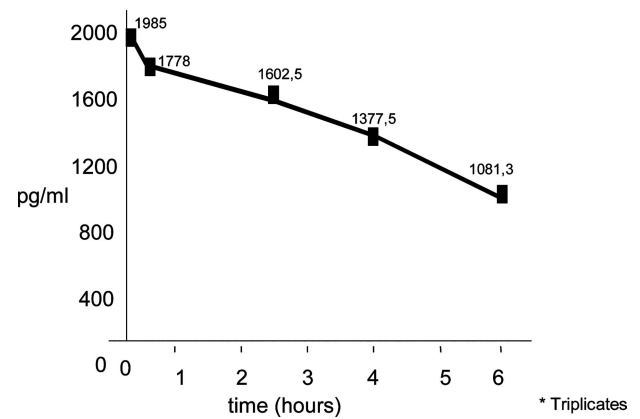
CTC = National Cancer Institute Common Toxicity Criteria

levels. However, moderate local discomfort in the injection site was documented in both patients and led to treatment discontinuation. Considering the need of a continuous daily subcutaneous administration of RC-3095, the twice-daily administration was considered inappropriate for further trials, with local toxicity being therefore dose-limiting.

It was then decided to include an additional group of patients at a once-daily RC-3095 administration at the dose of 96 ug/kg. Seven patients received a median of 2 [2, 3] courses of RC-3095. No significant clinical toxicity was again observed, apart from mild local toxicity in three patients. This dose level was considered suitable to be recommended for future phase II trials, although improvements in drug formulation would be desirable. In Table 3, the clinical toxicity of RC-3095 is presented for patients included at the various dose levels.

Although no evidence of objective antitumor activity was documented in patients included in the study up to the above mentioned dose escalation level, an almost 30% reduction in the product of two perpendicular diameters a left supraclavicular tumor mass was observed in one patient with a refractory medullary carcinoma of the thyroid, who received RC-3095 at dose level III (32 ug/kg once-daily). Notably, the patient was suffering from a severe VIPoma-like secretory diarrhea for three months, and showed a dramatic improvement in her gastrointestinal symptoms. Her plasma calcitonin levels were also transiently decreased. This effect lasted for about 8 weeks and then the patient showed progressive disease and died.

Considering that bombesin exhibits a high structural homology with the gastrin-releasing peptide (GRP), plasma gastrin levels were measured in patients at the various dose levels of RC-3095 in an attempt to identify a dose level, in which a surrogate marker of a biological effect could be observed, meaning, an RC-3095-dependent reduction of plasma gastrin levels in the patients. Although a tendency

**Fig. 2** Plasma gastrin levels following RC-3095 administration (96 ug/kg SC) in a patient with Zollinger-Ellison Syndrome*

for a drop in gastrin levels was observed in some patients, the data was inconsistent and a large inter-patient variability made interpretation of results very difficult.

We then hypothesized that a “proof-of-concept” could be attempted by evaluating the effect of a single-dose of RC-3095 (at the highest dose level) in a clearly hypergastrinemic patient. For that purpose, our local Institutional Review Board (IRB) approved the use of a single-case study of the effect of RC-3095 in the plasma gastrin levels of a patient with the Zollinger-Ellison Syndrome (clearly hypergastrinemic). The study consisted of a single RC-3095 subcutaneous injection at the highest dose level (96 ug/kg). The basal plasma gastrin level which was 20 times higher than normal in this patient dropped to about 50% 6 h following RC-3095 administration (Figure 2).

Initial plasma pharmacokinetic studies performed in our patients were unsuccessful due to technical problems with the method. A suitable analytical method for RC-3095 in plasma became available only towards the completion of the study [20]. For that reason, plasma obtained from patients included in the initial part of the study was insufficient for additional analyses. Therefore, we could only obtain sufficient amounts of plasma for analysis from two patients included at the highest once-daily dose level. In Table 4, the main pharmacokinetic parameters of RC-3095 are summarized. In Figure 3, the plasma concentration-time curves of RC-3095 is illustrated with data obtained from the patients. It should be noted that the baseline drug concentration was not zero, suggesting that the assay was not accurate at lower concentrations.

The effects of RC-3095 on the plasma levels of EGF, VEGF and FGF were studied in patients included at the highest dose level, but showed inconsistent results (data not shown). Skin biopsies were also collected from some patients treated at the highest dose level, prior and 14 days after drug administration for the analysis of EGF, VEGF and FGF receptor expression. No clear correlation between drug effects

Table 4 Pharmacokinetic parameters in two patients who received RC-3095 by SC daily administration at the highest dose level (dose level VII, 96 ug/kg)*

Parameter	Patient AS	Patient LM
Tmax (h)	0.067	0.300
Cmax (ng/mL)	640	604
Tlast (h)	8	8
Clast (ng/mL)	115	112
AUClast (h*ng/mL)	1074	1363
Lambda.z (1/hr)	0.080	0.063
T _{1/2} (h)	8.64	10.93
AUCall (h*ng/mL)	1074	1363
AUCINF_obs (h*ng/mL)	2503	3134
Vz_F_obs (L)	29.9	30.2
Cl_F_obs (L/hr)	2.4	1.9

*The values reported in the table are based on a model for IV administration.

and changes in receptor expression could be observed. The only exception was the observation of a high expression of GRP receptors in a tumor specimen obtained from a patient with advanced medullary carcinoma of the thyroid, who had a short-lasting minor tumor response (Figure 4).

Discussion

The mammalian BN/GRP peptide was shown to act as a growth-factor in various human malignancies [21–25] and

to possess a range of neuroendocrine activities [26–29]. The inhibition of this growth-factor pathway via the administration of selective BN-like receptor antagonists was shown to produce impressive tumor responses in murine and human tumors models at dose ranges in which no significant toxic effects could be demonstrated [30–33].

In our study, we report on the results of the first clinical trial of the BN/GRP receptor antagonist RC-3095 in patients with advanced malignancies. Although several logistical difficulties had to be overcome to complete its initial evaluation, mainly in terms of drug formulation and supply, preliminary information could be gathered from its initial evaluation in man. In contrast with a classical phase I trial design, in which the toxicity profile, the maximum tolerated dose (MTD) and the recommended dose for phase II trial are described, we tried to incorporate pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters to help us in guiding the dose escalation of RC-3095 and to recommend a suitable dose schedule for Phase II studies.

The dose of RC-3095 was escalated in groups of patients with refractory advanced malignancies from 8 to 96 ug/kg given daily by subcutaneous injection. The lack of significant organ toxicity in our patients confirmed previous observations in animal toxicology studies. There were no cases of drug-related alopecia, bone marrow or gastrointestinal toxicity in patients receiving RC-3095 in dose range applied in the study.

As there was a suggestion that RC-3095 could down-regulate EGF receptor expression in experimental tumors and that this effect could be maximized by a twice-daily administration (A.V. Schally, personal communication), the protocol was amended from a twice-daily administration from dose levels III to VI. However, local pain and induration at the injection site caused discomfort in patients receiving the drug at the highest dose levels. For the above reason, we decided to return to a once-daily schedule at the dose of 96 mg/kg (dose level VII), which was well tolerated by the patients.

Considering the high structure homology between bombesin and the GRP, plasma gastrin levels were studied in patients included in the trial, as a potential surrogate marker of the biological effect of the antagonist RC-3095. Although plasma gastrin levels decreased in some patients following RC-3095 administration, it showed a large variability and failed to safely guide dose escalation. However, a “proof of concept” was tried to be incorporated into the study, which consisted of the administration of a single dose of RC-3095 given at the recommended dose for further trials (96 ug/kg) in a clearly hypergastrinemic individual with the Zollinger-Ellison syndrome. This procedure was approved by our local IRB and included a written informed consent by the patient. Interestingly, the plasma gastrin levels dropped to 50% the basal levels 6 h following

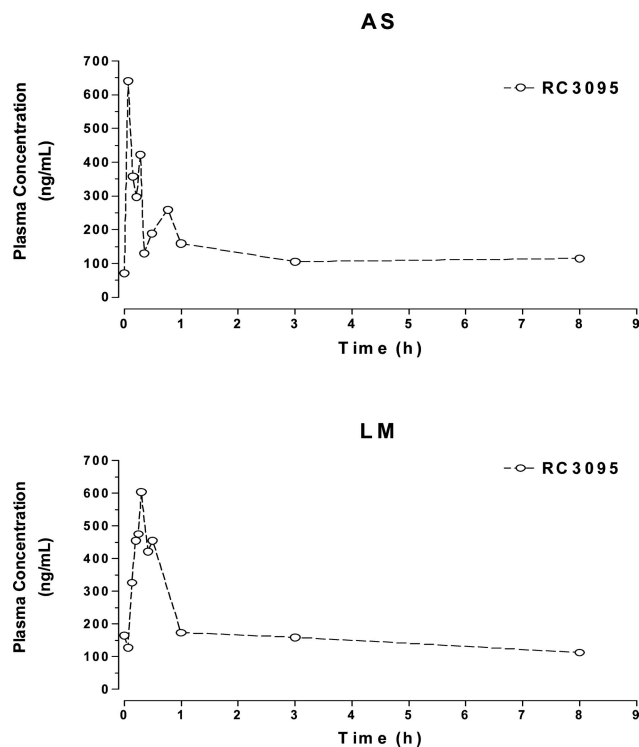


Fig. 3 Plasma concentration versus time curves in patients receiving RC-3095 by SC administration at the dose of 96 ug/kg

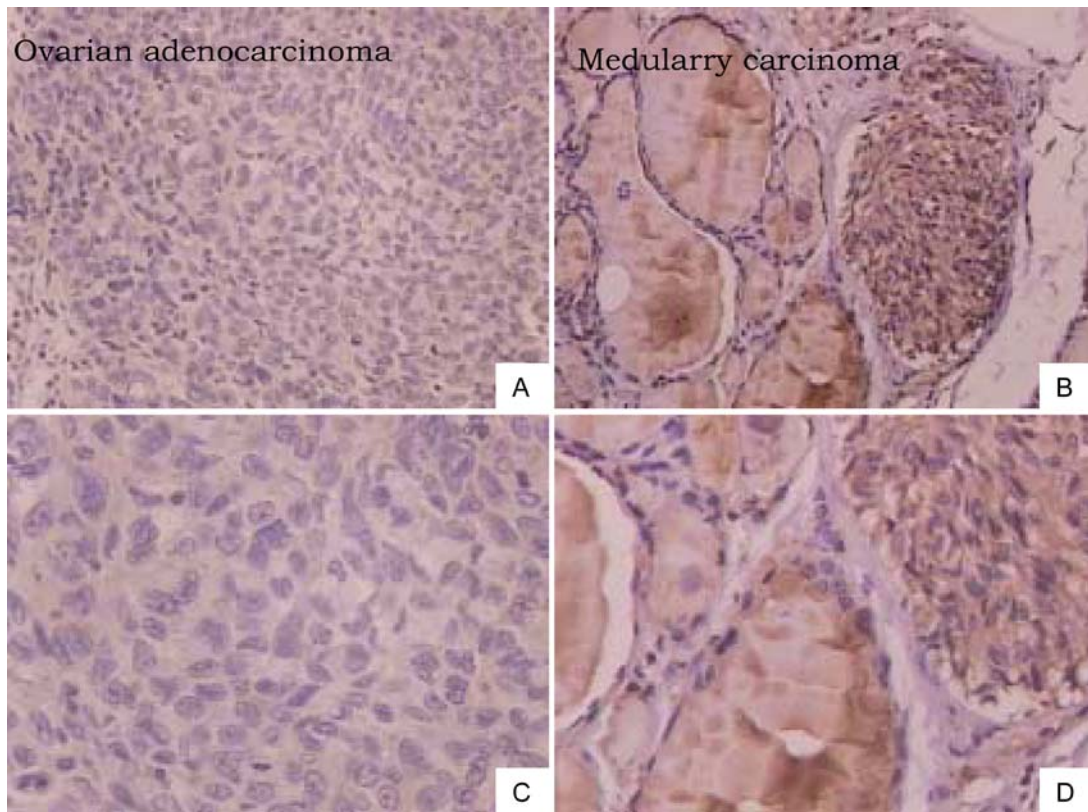


Fig. 4 Figure 1: Anti-GRPR staining in tumors. Example of positive and negative staining. A and B show a case of ovary carcinoma. None of the ovary studied samples were positive. B and D show medullary thyroid carcinoma. Normal follicle cells have clear cytoplasm and were only stained by hematoxylin, being considered negative. At the right side of

these normal follicles cells from carcinoma show a strong staining with DAB, being considered positive. Follicle colloid is stained because of technical artifact. All samples were stained with Hematoxylin. Upper pannels 100 × magnification. Lower pannels 200 × magnification

the administration of RC-3095. This observation could be either a drug-related effect or simply due to circadian variation.

Evidence of an anti-tumor effect of RC-3095 was obtained from only one patient included in the trial, though it did not reach the criteria for an objective response. It was in a patient with progressive medullary carcinoma of the thyroid, who showed a short-lasting minor response in a metastatic supraclavicular lymph node mass. Although it was not documented by sequential imaging techniques, this lesion was measured in two perpendicular diameters during various occasions by more than one of the physicians of our team. The patient had also a resolution of a secretory-type (VIPoma-like) diarrhea, which was refractory to various symptomatic treatments including the use of high-dose loperamide and octreotide. The review of her histopathological slides confirmed the expression of GRP receptors in the tumor, perhaps explaining the biological effect observed with our bombesin/GRP antagonist RC-3095. The observation of a high expression of GRP receptors in medullary carcinoma of the thyroid was previously reported [34, 35].

When we started our phase I trial, there was no reliable method for the quantification of RC-3095 in human plasma.

Later on, a liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method became available for its quantification [20]. A review of a limited plasma sampling obtained from two patients included at the highest dose level suggests that the current assay has poor accuracy at lower drug concentration. Our results, however, deserve further studies, because RC-3095 plasma drug concentrations in the patients were within the range of those previously shown in RC-3095-responding tumor-bearing mice (>100 ng/ml for about 8 h) [19].

Based on data obtained from the first 25 patients with advanced refractory solid malignancies exposed to RC-3095 at various dose levels, no systemic toxicity related to this agent was observed. Local discomfort at the injection site at the highest dose levels was the only adverse effect demonstrated in our patients. This was a major limitation to the continuation of our dose escalation procedure. Considering the difficulties faced by us to complete the safety analysis of RC-3095, this study can be considered inconclusive in terms of dose and schedule recommendations. Improvements in drug formulation, especially slow-release forms of RC-3095 administration, as well as the evaluation of other BN/GRP analogues exhibiting a more favorable

pharmacokinetic behavior are warranted to better evaluate this novel and interesting experimental therapeutic approach.

References

- Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F (2005) Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 49:293–300
- Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, et al. (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature* 316:823–836
- Nelson J, Dornelly M, Walker B, Gray J, Shaw C, Murphy RF (1991) Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. *Br J Cancer* 63:933–936
- Bologna M, Gestuccia C, Muzi P, Ciomei M (1989) Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells *in vitro*. *Cancer* 63:1714–1720
- Carney DN, Cuttitta F, Moody TW, Minna JD (1987) Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res* 47:821–825
- Sun B, Schally AV, Halmos G (2000) The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul Pept* 90:77–84
- Qin Y, Ertl T, Cai R-Z, Halmos G, Schally AV (1994) Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 54:1035–1041
- Hajri A, Balboni G, Koenig M, Garaud JC, Damge C (1992) Gastrin-releasing peptide: *in vivo* and *in vitro* growth effects on an acinar pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 52:3726–2732
- Kelley MJ, Linnoila RL, Avis IL, Georgiadis MS, Cuttitta F, Mulshine JL, et al. (1997) Antitumor activity of a monoclonal antibody directed against gastrin-releasing peptide in patients with small cell lung cancer. *Chest* 112:256–261
- Cai R-Z, Radulovic S, Pinski J, Nagy A, Redding TW, Olsen DB, Schally AV (1992) Pseudononapeptide bombesin antagonists containing C-terminal Trp or Tpi. *Peptides* 13:267–271
- Cai R-Z, Reile H, Armatis P, Schally AV (1994) Potent BN antagonists with C-terminal LeuΨ(CH₂N)Tac-NH₂ or its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12664–12668
- Pinski J, Yano T, Rekasi Z, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV (1992) 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
- Kiaris H, Schally AV, Sun B, Armatis P, Groot K (1999) Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene* 18:7168–7173
- Yano T, Pinski J, Groot K, Schally AV (1992) Stimulation and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 52:4545–4547
- Qin Y, Halmos G, Cai R-Z, Szoke B, Ertl T, Schally AV (1994) 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
- Chatzistamou I, Schally AV, Sun B, Armatis P, Szepeshazi K (2000) 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
- Koppan M, Halmos G, Arencibia JM, Lamharzi N, Schally AV (1998) Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the level and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. *Cancer* 83:1335–1343
- Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K (2004) Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 90(1):245–252
- Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE (1997) A single *in vivo* administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MTX mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10913–10918
- Pereira AS, Di Leone L, Souza FH, Lilla S, Richter M, Schwartzmann G, De Nucci G (2005) Quantification of the bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 816(1–2):321–32620
- Pinski J, Reile H, Halmos G, Groot K, Schally AV (1994) Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res* 54:169–174
- Pinski J, Halmos G, Yano T, Szepeshazi K, Qin Y, Ertl T, Schally AV (1994) Inhibition of growth of MKN-45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analog RC-160. *Int J Cancer* 57:574–580
- Liebow C, Crean D, Lee MT, et al. (1994) Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proc Natl Acad Sci* 91:3804–3808
- Schwartzmann G (2004) Dexamethasone and gastrin-releasing peptide receptors in human lung cells. *Lung Cancer* 46:129
- Radulovic S, Miller G, Schally AV (1991) 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
- Radulovic S, Schally AV, Reile H, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, Milovanovic S, Miller G, Yano T (1994) Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. *Acta Oncol* 33:693–701
- Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G (2004) Neuropeptides and anxiety disorders: Bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 25:241–242
- Roesler R, Kopschina MI, Rosa RM, Henriques JA, Souza DO, Schwartzmann G (2004) RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol* 13:35–41
- Roesler R, Lessa D, Venturella R, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartzmann G (2004) Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 19:1041–1045
- Shirahige Y, Cai R-Z, Szepeshazi K, Halmos G, Pinski J, Groot K, Schally AV (1994) Inhibitory effect of bombesin gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3095-II and RC-3095 on MCF7 MIII human breast cancer xenografts in nude mice. *Biomed Pharmacother* 48:465–472
- Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Groot K, Radulovic S (1992) Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen-independent MXT mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095. *J Natl Cancer Inst* 84:1915–1922
- Szepeshazi K, Schally AV, Groot K, Halmos G (1993) Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP)(14–27) and bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 on growth of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. *Int J Cancer* 54:282–289
- Yano T, Pinski J, Szepeshazi K, Halmos G, Radulovic S, Groot K, Schally AV (1994) Inhibitory effect of bombesin/gastrin releasing

- peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer* 73:1229–1238
34. Ide A, Ashizawa K, Ishikawa N, Ishii R, Ando T, Abe Y, Sera N, Usa T, Tominaga T, Ejima E, Nakashima M, Ito K, Ito K, Eguchi K (2001) Elevation of serum pro-gastrin-releasing peptide in patients with medullary thyroid carcinoma and small cell lung carcinoma. *Thyroid* 11:1055–1061
35. Weber CJ, O'Dorisio TM, Howe B, D'Agati V, Ward L, Russell J, Feind CR (1991) Vasoactive intestinal polypeptide-, neurotensin-, substance P-, gastrin-releasing peptide-, calcitonin-, calcitonin gene related peptide-, and somatostatin-like immunoreactivities in human parathyroid glands. *Surgery* 110(6):1078–1085