



HU000230273B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **230 273**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 00203**(22) A bejelentés napja: **2002. 03. 05.**(40) A közzététel napja: **2004. 08. 30.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2015. 11. 30.**(51) Int. Cl.: **A61K 313/35** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 02/06746

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 02072085

| | |
|---|---|
| (30) Elsőbbségi adatok: 60/275,801 2001. 03. 14. US 60/316,395 2001. 08. 31. US | (73) Jogosult(ak): Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, New Jersey (US) |
| (72) Feltaláló(k): Lee, Francis Y.F., Yardley, Pennsylvania (US) | (74) Képviselő: SBGK Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest |

(54) **Egy epotilon analóg és kemoterápiás szerek kombinációja proliferatív betegségek kezelésére**

(57) Kivonat

A találmány az onkológia területére és javított kemoterápiás alkalmazásokra vonatkozik. Az epotilon analógok szinergikus hatást mutatnak bizonyos hagyományos kemoterápiás szerekkel való kombinációban. A találmány tárgyát hatékony kemoterápiás szerek kombinációkban való alkalmazása képezi, ahol az epotilon analógokat más antineopláziás szerekkel kombinálják proliferatív betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

Egy epotilon analóg és kemoterápiás szerek kombinációja proliferatív betegségek kezelésére

A találmány az onkológia területére vonatkozik.

Rendelkezésre bocsátja az 1-15. igénypontokban meghatározott két rákellenes hatóanyag kombinációját, valamint ilyen kombinációkat proliferatív betegségek kezelésében való alkalmazásra.

A National Cancer Institute (Nemzeti Rák Intézet, Amerikai Egyesült Államok) becslése szerint csak az Amerikai Egyesült Államokban három ember közül egy személy élete folyamán rákbetegséget kap. Ráadásul a rákos betegek körülbelül 50-60%-a meghal a betegségben. A betegség széles körű elterjedtsége alátámasztja a rák elleni kezelések javításának szükségességét.

A rákok jelenleg megfigyelt nagy változatossága miatt számos rák elleni szert fejlesztettek ki a rák megsemmisítésére a szervezetben belül. Ezeket a vegyületeket azzal a céllal adják be a rákos betegeknek, hogy elpusztítsák a rosszindulatú sejteket, vagy más módon meggátolják szaporodásukat, miközben a normális egészséges sejtek zavartalanul működnek. A rák elleni szereket hatásmechanizmusuk alapján osztályozzák.

A kemoterápiás szerek egyik típusát a fémkoordinációs komplexek képezik. Úgy vélik, hogy az ilyen típusú kemoterápiás szer túlnyomórészt DNS szálon belüli keresztalkötéseket képez a sejtmagokban, így megakadályozza a sejtreplikációt. Ennek eredményeképpen a daganatnövekedés először lelassul, majd visszajára fordul. A kemoterápiás szerek másik típusát az alkilezőszerek képezik. Ezek idegen vegyületeket vagy molekulákat építenek be az

osztódó rákos sejtek DNS-ébe. Az idegen csoportok hatására a rákos sejtek normál működése megszakad, és szaporodásuk megáll. A kemoterápiás szerek további típusát az antineopláziás szerek képezik. Ezek a szerek megelőzik vagy blokkolják a rákos sejtek szaporodását és terjedését, illetve megölik az ilyen sejteket. A rák elleni szerek további típusai a nem szteroid aromataz inhibitorok, bifunkcionális alkilezőszerek stb.

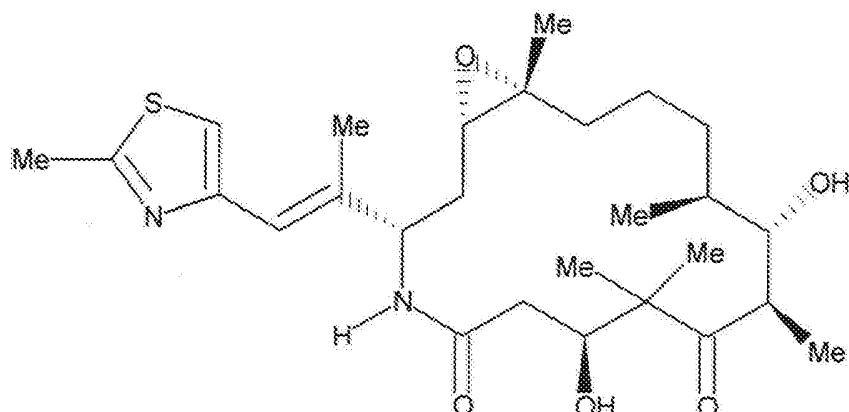
A paclitaxel képviseli a mikrotubulus elleni szerek egyik legnagyobb csoportját, amely elősegíti a tubulinpolimerizációt, és feltételezhetően leállítja a mitotikus folyamatot a sejtosztódás során. A Taxol[®] (paclitaxel) kitűnő tumorelleses hatást mutat in vivo, és többféle rák, köztük mellrák, petefészekrák és tüdőrák kezelésében alkalmazták. Sajnos többféle tumor rezisztenciát fejlesztett ki paclitaxellal szemben.

A feltalálók azt találták, hogy az epotilon analógok szinergikus hatást mutatnak bizonyos hagyományos kemoterápiás szerekkel való kombinációban. A találmány tárgya hatékony kemoterápiás szer kombinációkkal való kezelési eljárás rendelkezésre bocsátása proliferatív betegségek kezelésére, ahol egy epotilon analóg más antineopláziás szerekkel van kombinálva.

A WO 99/02514 nemzetközi közrebocsátási irat közli az igénypontokban meghatározott epotilon származék 1 vegyület alkalmazását rák kezelésére (1. igénypont, 65. oldal, 2 vegyület). Javasolt a más citotoxikus hatóanyagokkal való kombináció. Megemlíti, hogy az epotilin származékot előnyösen további olyan citotoxikus hatóanyagokkal kombinálják, ahol a választott második hatóanyag a sejtciklus egy másik fázisában - például S-fázisban

- hat, mint az igényelt vegyületek (10. oldal, 15-30. sorok).

A találmány kombinációkat bocsát rendelkezésre proliferatív betegségek, köztük rák kezelésében való alkalmazásra. A kombinációk magukban foglalnak (1) az igénypontokban meghatározott legalább egy antiproliferatív szert és (2) egy 1 vegyületet



A találmány továbbá rendelkezésre bocsájt egy gyógyszerkészítményt, amely magában foglal az igénypontokban meghatározott legalább egy antiproliferatív szert és egy 1 vegyületet és egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót.

Az antiproliferatív szert az 1 vegyület beadásával egyidejűleg vagy előtte vagy utána adják be.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra az 1 vegyület citotoxicitási spektrumát mutatja a tumor sejtvonalakra onkológiai diverz sejtvizsgálatban (Oncology Diverse Cell Assay). A jobb oldali oszlopgrafikonok megadják a bal oldali oszlopban (lentől felfelé) felsorolt sejtvonalak IC_{50} értékeit.

A 2. ábra a mitotikus blokádnak időbeli lefolyását mutatja be, a blokádot HCT116 sejtek inkubálása indítja be 7,5 nm 1 vegyület

jelenlétében.

A 4. ábra grafikonja az 1 vegyület és paclitaxel tumorel-
lenes aktivitásának összehasonlítása egy scPat-7 humán petefé-
szekrák karcinóma modellben.

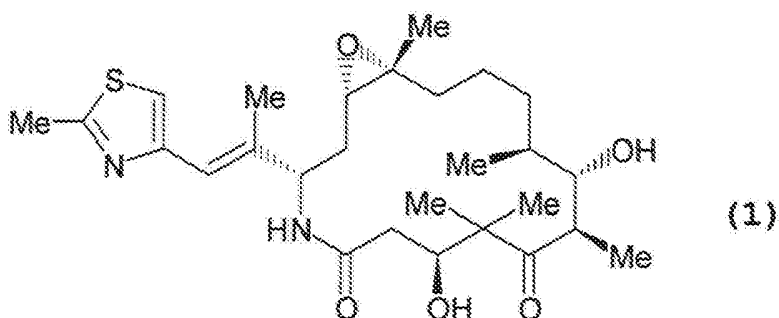
Az 5A. és 5B. ábra grafikonja az 1 vegyület orális adagolás
esetén és a paclitaxel intravénás beadásakor tapasztalt tumor-
ellenes hatásának összehasonlítását mutatja a Pat-7 humán pete-
fészek karcinóma modellben.

A 6. ábra grafikonja bemutatja az 1 vegyület tumorel-
lenes hatásának függését a kezelési ütemezéstől az A2780 humán petefé-
szek karcinóma modellben.

A találmány részletes leírása

Az epotilonok utánozzák a taxol biológiai hatását [Bollag et al.; Cancer Research, 55, 2325-2333 (1995)], és a kompetíciós vizsgálatokban a Taxol mikrotubulusokhoz való kötődésének kompetitív inhibitoraként hatnak. Azonban az epotilonok előnyösebbek a Taxolnál abban, hogy az előbbieket jóval kisebb potenciaesést mutatnak a Taxolnál a multigyógyszer-rezisztens sejtvonalakkal szemben [Bollag et al.; (1995)]. Továbbá az epotilonok jóval kisebb mértékben exportálódnak a sejtekből a P-glikoprotein által, mint a Taxol [Gerth et al.; (1996)].

Az előnyös epotilon analóg a találmány szerinti alkalmazásra az (1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*])-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)-etenil]-4-aza-17-oxa-biciklo[14.1.0]-heptadekán-5,9-dion (1 vegyület). Ezen vegyület (1 vegyület) képlete a következő:



Az **1** vegyület, a találmány szerinti epotilon analóg, egy szemiszintetikus epotilon analóg, hatásmódja analóg a paclitaxelével (azaz mikrotubulus-stabilizálás). Azonban az előzetes klinikai farmakológiai vizsgálatokban az **1** vegyület jelentős javulást mutatott a Paclitaxelhez képest néhány kritikus vonatkozásban. Az **1** vegyület jelentős és széles körű tumorelleses hatást mutat paclitaxelra érzékeny (A2780, HCT116 és LS174T), és ami fontosabb, paclitaxellal szemben rezisztens humán vastagbél tumorokra (HCT116/VM46), petefészek karcinóma (Pat-7 és A2780Tax) és mell karcinóma (Pat-21) modellekkel szemben. Az **1** vegyület orálisan hatékony; az orális bevitelt követő tumorelleses aktivitás összemérhető a gyógyszer parenterális bevitelét követő aktivitással. Ezek az előzetes klinikai adatok azt mutatják, hogy az **1** vegyület jobb klinikai hatékonyságot mutat a TAXOL®-ra nem érzékeny és érzékeny betegségtípusokkal szemben.

Az **1** képletű vegyületet legalább egy antineopláziás szerrel együtt adják be.

A leírásban az "antineopláziás szer" kifejezés szinonim a "kemoterápiás szer" és/vagy "antiproliferatív szer" kifejezésekkel, és olyan vegyületeket jelent, amelyek megelőzik a rákot, vagy a hiperproliferatív sejtek szaporodását. Az antiproliferatív szerek a rákos sejtek szaporodását 1) a sejt DNS repli-

kációs képességére való hatással és 2) a rákos sejtekben kiváltott sejthalállal és/vagy apoptózissal akadályozzák meg.

A találmány szerint alkalmazható antiproliferatív citotoxikus szerek: cisplatin, capecitabin, anti-VEGF antitestek, ZD6474 és SU6668 közül kiválasztott VEGF inhibitorok és az EGFR-re immun-specifikus Imclone antitest C225.

Tehát a jelen találmány szerinti kombinációk alkalmazhatók különböző rákok, köztük – de nem kizárólagosan – a következő rákok szinergikus kezelésére szolgáló eljárásokban:

karcinóma, beleértve hólyagrákot (közte gyorsult és metasztázisos hólyagrákot), mell-, vastagbél- (közte vastag- és végbél) rák, vese-, máj-, tüdő- (közte kis és nem kissejtes tüdőrák és tüdő adenokarcinóma), petefészek-, prosztatata-, here-, húgy- és ivarszervi, limfatikus rendszeri, végbél-, gége-, hasnyálmirigy- (közte exokrin hasnyálmirigy karcinóma), nyelöcső-, gyomor-, epehólyag-, méhnyak-, tiroid- és bőrrák (közte pikkelyes sejt karcinóma);

a limfoid vonal hematopoietikus tumorai, köztük a leukémia, akut limfocita leukémia, akut limfoblaszt leukémia, B-sejt limfóma, T-sejt limfóma, Hodgkin limfóma, nem-Hodgkin limfóma, hajás sejt limfóma, hisztiocitikus limfóma és Burkett limfóma;

a mieloid vonal hematopoietikus tumorai, közte akut és krónikus mielogén leukémiák, mielodiszpláziás tünetegyüttes, mieloid leukémia és promielocitikus leukémia;

a központi és perifériás idegrendszer daganatai, köztük asztocitoma, neuroblasztoma, glioma és scwannoma;

mezenchimális eredetű tumorok, közte fibroszarkóma, rhabdomyosarkóma és oszteosarkóma; és más tumorok, köztük melanóma, xenoderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, tiroid follukuláris rák és teratocarcinóma.

A találmány legelőnyösebben gyorsult vagy metasztázisos hólyagrák, hasnyálmirigy rák, prosztatatarák, nem kissejtes tüdőrák, végbélrák és mellrák kezelésére alkalmazható.

A legtöbb kemoterápiás szer biztonságos és hatékony beadási módja ismert a gyakorlott szakember számára. Emellett adagolását a szakirodalom megadja.

Például számos kemoterápiás szer adagolását ismerteti a "Physicians' Desk Reference" (PDR), például az 1996-os kiadás (Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645-1742, USA).

Az 1 vegyület előállítható a WO/9902514 számú nemzetközi közrebocsátási iratban leírt eljárásokkal.

A jelen találmány tárgyát képezi egy gyógyszerészeti kombináció is, amely alkalmazható rák kezelésében, ami magában foglalja a találmány szerinti kombináció gyógyászatilag hatásos mennyiségének gyógyszerészetileg elfogadható hordozókkal vagy hígítókkal vagy ezek nélkül való beadását. A találmány szerinti szinergikus gyógyszerészeti kompozíciók magukban foglalnak egy antiproliferatív szert vagy szereket, az 1 vegyületet és egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót.

A jelen találmány szerinti kompozíciók magukban foglalhatnak továbbá egy vagy több gyógyszerészetileg elfogadható kiegészítő alkotórészt, így alumínium-oxidot, stabilizálószereket, antimik-

robiális szereket, pufferokat, színező anyagokat, ízesítő szereket, adjuváncokat és hasonlókat. A találmány szerinti antineopláziás szerek, az 1 vegyület és kompozíciók beadhatók orálisan vagy parenterálisan, beleértve intravénás, intramuszkuláris, intraperitoneális, szubkután, rektális és helyileg történő beadási módokat.

Orális alkalmazás esetén az antineopláziás szerek, az 1 vegyület és a jelen találmány szerinti kompozíciók beadhatók például tabletták vagy kapszulák, porok, diszpergálható granulátum, ostyák, vizes oldatok vagy szuszpenziók formájában. Orális alkalmazásra szánt tabletták esetében az általában használt hordozók laktózt, kukoricakeményítőt, magnézium-karbonátot, talkumot és cukrot, valamint síkosító szereket, például magnézium-sztearátot tartalmaznak. Orális alkalmazásra szánt kapszulák esetén a hordozó laktózt, kukoricakeményítőt, magnézium-karbonátot, talkumot és cukrot tartalmaz. Ha vizes szuszpenziót alkalmaznak orális beadáskor, rendszerint emulgeálószeret és/vagy szuszpendálószeret is adnak a készítményhez.

Emellett édesítő és/vagy ízesítő szerek is adhatók az orális kompozíciókhoz. Intramuszkuláris, intraperitoneális, szubkután és intravénás alkalmazáskor a hatóanyag(ok) steril oldatát alkalmazzzák, az oldatok pH-ját megfelelően beállítják és pufferolják. Intravénás alkalmazás esetén az oldott anyag(ok) összkonzentrációját szabályozni kell, hogy a készítmény izotóniás legyen.

A találmány szerinti kúpok készítésekor az alacsony olvadáspontú viaszt, például a zsírsav-gliceridet vagy kakaóvaját először megolvasztják, majd a hatóanyagot homogénean diszpergálják a

viaszban, például keveréssel. Az ömlesztett homogén elegyet azután megfelelő méretű formákba öntik, és hagyják kihűlni, azaz megszilárdulni.

A folyékony készítmények lehetnek oldatok, szuszpenziók és emulziók. Ilyen készítményekre példaként említhetők a vizes vagy vizes/propilén-glikolos oldatok parenterális injekcióhoz. A folyékony készítmények lehetnek intranazális oldatok is.

Inhalálásra megfelelő aeroszol készítmények lehetnek az oldatok és szilárd anyagok por formában, amelyeket gyógyszerészetiileg elfogadható hordozóval, például inert sűrített gázzal lehet kombinálni.

Alkalmazhatók szilárd készítmények is, amelyeket röviddel a felhasználás előtt alakítanak át folyékony készítménnyé, orális vagy parenterális alkalmazásra. Ilyen folyékony formák az oldatok, szuszpenziók és emulziók.

Az 1 vegyület és az itt leírt neopláziás szerek beadhatók bőrön át is. A transzdermális készítmények lehetnek krémek, folyadékok, aeroszolok és/vagy emulziók, ezek bevihetők mátrix vagy tartály típusú tapaszba, a szakirodalomból ismert eljárások szerint.

A találmány szerinti kombinációk alkalmazhatók más jól ismert gyógyászati megoldásokkal, amelyeket a kezelendő betegség elleni hatékonyság alapján választanak ki.

Ha a formulázás rögzített adagban történik, a találmány szerinti kombináció hatóanyagait a lent megadott dózistartományban adagolják. Másik megoldás szerint az antineopláziás szer és az 1 vegyület beadható külön is az alább leírt dózistartományokban. A

találmány egy előnyös megvalósításában az antineopláziás szert az alább leírt dózistartományban vagy az 1 vegyület után vagy azzal egyidejűleg adják be az alább leírt dózistartományban.

Az 1. táblázat bemutatja az előnyös kemoterápiás kombinációkat és példaként szolgáló adagolásukat a jelen találmány szerinti eljárásokban. Az "(I) általános képletű vegyület" alatt az 1 vegyület értendő.

1. táblázat

| KEMOTERÁPIÁS KOMBINÁCIÓ | ADAGOLÁS, mg/m ² (adagonként) |
|--|--|
| (I) általános képletű vegyület + Cisplatin | 0,1-100 mg/m ² 5-150 mg/m ² |
| (I) általános képletű vegyület + Gemcitabine + Cisplatin | 0,1-100 mg/m ² 100-3000 mg/m ² 5-150 mg/m ² |
| (I) általános képletű vegyület + Cisplatin + paclitaxel | 0,1-100 mg/m ² 5-150 mg/m ² 40-250 mg/m ² |
| (I) általános képletű vegyület + Cisplatin + 5FU | 0,1-100 mg/m ² 5-150 mg/m ² 5-5000 mg/m ² |
| (I) általános képletű vegyület + besugárzás + 5FU + Cisplatin | 0,1-100 mg/m ² 200-8000 cGy 5-5000 mg/m ² 5-150 mg/m ² |

Az 1. táblázatban az "5-FU" jelentése 5-fluor-uracil, és a "Leucovorin" leucovorin-kalcium formájában alkalmazható.

Bár az 1. táblázat megad az 1 vegyületre és bizonyos találmány szerinti rákellenes szerekre példaként dózistartományokat, a találmány szerinti gyógyszerészeti kompozíciók formulázásakor a klinikus alkalmazhat előnyös dózisoskat a kezelendő beteg állapótól függően. Például az 1 vegyület előnyösen 25-60 mg/m² adagban beadható háromhetenként. A Cisplatin előnyös dózisa 75-120 mg/m², háromhetenként. Ha az eljárás során besugárzást is alkalmaznak, az előnyös dózis 200-6000 cGy. A paclitaxel előnyös adagja 130-225 mg/m² 21 naponként. A Gemcitabine előnyös adaja 80-1500 mg/m² hetente. Az előnyös Leucovorin dózis 10-600 mg/m² hetente advas.

A ténylegesen alkalmazott adag változhat a beteg szükségleteitől és a betegség súlyosságától függően. Konkrét helyzetben a megfelelő adagot a szakember határozza meg. Általában a kezelést kisebb adaggal kezdik, amely kevesebb az adott vegyületre jellemző optimális mennyiségnél. Azután az adagot kis mennyiségekkel növelik, amíg az adott körülmények között el nem érik az optimális hatást. Kényelmi okokból a teljes napi adagot eloszthatják, és adagokban adhatják be a nap folyamán, szükség esetén. A megszakításos terápia (például háromhetente egy hét, vagy négyhetente három hét) szintén alkalmazható.

Egyes rákokat hatékonyan lehet kezelni 1 vegyülettel és többféle rákellenes szerrel. Az ilyen háromszoros, négyszeres kombinációk hatékonyabbak. Ha háromszoros, négyszeres kombinációt alkalmaznak, a fent megadott adagolás a mérvadó. További kombinációk a fenti 1. táblázatban tartalmazhatják az "1 vegyületet" Doxorubicin + Carboplatin hatóanyagokkal kombinálva.

A jelen találmány szerinti kompozíciók alkalmazásakor további szerek is felhasználhatók a tumornövekedés vagy metasztázis modulálására a klinikai beállítások során, például kívánt esetben hányás elleni szerek is beadhatók.

A neopláziás szert és az 1 vegyületet egyidejűleg vagy egymást követően adják be. Így, amíg egy antineopláziás szer(ek)e)t és az 1 vegyületet tartalmazó gyógyszerkészítmény előnyös lehet egy adott kezelés során a kombináció beadásakor, egy másik kezelés esetében az antineopláziás szer(ek) ezt megelőző beadása lehet az előnyös. Tudnivaló, hogy az antineopláziás szer(ek) és az 1 vegyület kombinációja alkalmazható más rákkezelési (előnyösen rákos tumorok kezelési) módszerekkel együtt is, beleértve radiációs terápiát és sebészeti műtétet. Tudnivaló továbbá, hogy egy citosztatikum vagy csillapító szer, ha alkalmazzák, beadható egymást követően vagy egyidejűleg az összes többi szinergikus terápiával.

A találmány szerinti kombinációk együtt is beadhatók más jól ismert terápiás szerekkel, amelyeket konkrét előnyük miatt választanak ki a kezelendő betegség esetében. A találmány szerinti kombinációk más változat szerint alkalmazhatók egymás után ismert gyógyszerészetileg elfogadható szer(ek)ekel, ha a többszörös kombinációs készítmény nem felel meg.

A kemoterápiás szer(ek) és/vagy sugárterápia alkalmazható a szakirodalomból jól ismert terápiás eljárás szerint. A szakember számára nyilvánvaló, hogy a kemoterápiás szer(ek) és/vagy sugárterápia változhat a kezelendő betegségtől, a kemoterápiás szer(ek)nek és/vagy sugárterápiának az adott betegségre gyako-

rott ismert hatásától függően. A gyakorlott orvos tudásától függően a terápiás eljárás (például az adagolt mennyiségek és beadási idők) változhat a beadott gyógyszereknek (vagyis anti-neopláziás szer(ek)nek vagy a besugárzásnak a betegre gyakorolt hatásától függően, és a betegségnek a beadott terápiás szerre adott reakciójától függően.

Az 1 vegyület egy antiproliferatív szerrel párhuzamosan vagy egymást követően adják be. Tehát nem szükséges, hogy a kemoterápiás szer(ek)et és az 1 vegyületet egyidejűleg vagy lényegében egyidejűleg alkalmazzák. Az egyidejűleg vagy lényegében egyidejűleg való beadás előnye a gyakorlott orvos megítélésétől függ.

Általában az 1 vegyületet és a kemoterápiás szer(eke)t nem kell ugyanabban a gyógyszerészeti kompozícióban beadni, különböző fizikai és kémiai jellemzőiktől függően beadagolhatók különböző módokon is. Például az 1 vegyület beadható orálisan, hogy a vérben jó koncentrációt érjenek el és tartsanak fenn, miközben a kemoterápiás szer(eke)t be lehet adni intravénásan. A beadás módjának meghatározása és a beadás ajánlható volta, ahol lehetséges, ugyanabban a gyógyszerkészítményben a gyakorlott orvos megítélésétől függ. A kezdeti adagolás megvalósítható a szakmában szokásos eljárás szerint, majd a megfigyelt hatástól függően az adagot, a bevétel módját és a beadási időket a gyakorlott orvos módosíthatja.

Az 1 vegyület és az antiproliferatív citotoxikus szer(ek) vagy besugárzás kiválasztása függ az orvos által felállított diagnózistól, a beteg általa megítélt állapotától és a megfelelő kezelési eljárástól.

Ha az 1 vegyületet és az antineopláziás szer(eke)t nem egyidejűleg vagy lényegében egyidejűleg alkalmazzák, az 1 vegyület és az antineopláziás szer(ek) beadásának rendje változhat. Így például az 1 vegyületet be lehet adni először, majd következhet(nek) az antoproliferatív szer(ek), vagy először beadhatják az antiproliferatív szer(eke)t, majd ezután adják be az 1 vegyületet. Ez a változó adagolás ismételhető egy kezelési eljárás alatt. A beadagolás sorrendje és az egyes terápiás szerek ismétléseinek száma a kezelési eljárás során a gyakorlott orvos megítélésétől függ, a kezelt betegség és a beteg állapota értékelése nyomán. Például az antineopláziás szer(ek) adható(k) először, elsősorban ha citotoxikus szert alkalmaznak. A kezelést azután az 1 vegyület beadásával lehet folytatni, majd adott esetben citosztatikus szert lehet beadni, ha szükséges, amíg a kezelési eljárás véget nem ér.

Tehát az orvos, tapasztalataitól és tudásától függően változtathatja az eljárásokat egy komponens (terápiás szer, azaz 1 vegyület, antoneopláziás szer(ek)) beadásával kapcsolatban az adott beteg szükségletei szerint a kezelés folyamán.

A kezelő orvos ítéli meg, hogy a kezelés hatékony-e az adott dózis mellett, megállapítja a beteg általános állapotát a pontosabban körülírt jelek alapján, például a betegség tüneteinek enyhülését, a tumornövekedés gátlását, a tumor tényleges zsugorodását vagy a metasztázis gátlását. A tumor mérete szabványos eljárásokkal mérhető, például radiológiai vizsgálatokkal, köztük CAT vagy MRI pásztázással, és az egymást követő mérések felhasználhatók annak megítélésére, vajon a tumornövekedés visszaszo-

rult-e, vagy esetleg visszafordult. A betegség tüneteinek, például a fájdalomnak az enyhülése, az általános állapot javulása szintén segít a kezelés hatékonyságának megítélésében.

A találmány jobb megértése érdekében a következő példák elsősorban a konkrétabb részletek szemléltetésére szolgálnak. A példák a találmány oltalmi körét semmiképpen nem korlátozzák, a teljes oltalmi kör meghatározása az igénypontokban található.

Kísérleti rész

Vegyületek:

A következő jelölést alkalmazzuk a példákban a tesztvegyületre:

1 vegyület: {1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]}-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)-etenil]-4-aza-17-oxa-biciklo[14.1.0]heptadekán-5,9-dion

Vegyszerek és oldatok:

Hacsak nincs másképp megadva, a sejttenyészet fenntartására szolgáló vegyszerek és oldatok a GIBCO/BRL cégtől származnak. A steril szövettenyésztő edényt a Corning, NY cégtől szerzik be. Az összes többi reagens a Sigma vagy Fisher cégtől ered, és a lehető legnagyobb tisztasági fokkal jellemezhető.

Hatóanyag-beadás:

Az 1 vegyület (egy epotilon) rágcsálóknak való beadására két különböző segédanyagot alkalmaztunk: 1) etanol/víz (1:9 v/v), 2) Cremophor®/etanol/víz (1:1:8, v/v). Az 1 vegyületet először etanolban vagy Cremophor®/etanol (50:50) elegyben oldjuk. A kívánt dózisra való végső hígítást a gyógyszerbeadást megelőző egy órán belül végezzük el. Parenterális beadásra (IV) a hígítást vízzel

végzik, így a dózisoldat a fent megadott specifikus segédanyag-összetételt tartalmazza. Orális beadáskor (PO) a hígítást 0,25 M nátrium-foszfát pufferrel (pH = 8,0) végzik 30/70 V/V arányban. A paclitaxelt 50/50 etanol/Cremophor® elegyben oldják és 4°C-on tárolják; a paclitaxel végső hígítását közvetlenül a gyógyszerbeadás előtt végzik 0,9% NaCl-oldattal. Az összes beinjektált ve- gyület térfogata 0,01 ml/g egér, illetve 0,005 ml/g patkány volt.

Tumor sejtvonalak:

HCT116 humán karcinoma sejtvonalakot és MDR variáns [1] HCT116/VM46 sejteket 10% hóvel inaktivált magzati marhaszérumot tartalmazó (GIBCO) McCoy féle 5A tápközegben (GIBCO) tartottak fenn. A2780 humán petefészek karcinóma sejteket és A2780Tax sejteket szereztek be az Antonio Fojo (NCI, Bethesda, MD) cégtől, és 10% magzati marhaszérumot (GIBCO) tartalmazó IMEM (GIBCO) táptalajon tartották fenn. A Paclitaxellel szemben rezisztens sejtvonala nem fejezi ki túlzottan a P-glikoproteint, de pontmutációkat mutat béta-tubulin M40 izotópban [2]. Tisztított tubulint izoláltak rezisztens sejtekből, ez ellenálló a Paclitaxel polimerizációval szemben, és feltételezhetően felelős a gyógyszerrezisztenciáért és az azt kísérő érzékenységet a mikrotubulus depolimerizáló szerekre, például vinblastine-ra.

Citotoxicitási vizsgálat:

Az in vitro citotoxicitást tumorsejtekben tetrazolium-alapú kolorimetriás vizsgálattal értékeltük, amely az MTS [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-karboxi-metoxi-fenil)-2-(4-szulfenil)-2H-tetrazolium, belső só] redukált formává való metabolikus átalakulását használja ki, amely 492 nm-nél abszorbeálja a fényt [3].

A sejteket a gyógyszerbeadás előtt 24 órával telepítették. 72 órás inkubálás után 37°C-on sorozathígítással kapott vegyületet, MTS-t és fenazin-metoszulfát elektrokapcsoló szert adtak a sejtekhez. Az inkubálást 3 órán át folytatták, majd a táptalaj abszorbanciáját spektrofotométerrel 492 nm-nél mérték, így megkapták a túlélő sejtek számát a kontroll populációhoz viszonyítva. Az eredményeket átlagos citotoxicitási koncentrációk formájában (IC₅₀ érték) adták meg.

Klonogén sejt kolóniaképzés vizsgálata

Azt a potenciát, amellyel az 1 vegyület és a Paclitaxel elöli a klonogén tumorsejteket (azokat a sejteket, amelyek végtelesen mennyiségben képesek osztódni kolóniaképzés céljából), in vitro értékelik a kolóniaképzési vizsgálattal. Meghatározták a klonogén HCT-116 humán vastagbélkarcinóma sejtek 90%-os előléséhez szükséges koncentrációt (vagyis az IC₉₀ értéket). A kombinációs kezelés in vitro hatásának elemzését izobologrammal és többszörözési módszerrel végezték Stephens és Steel [4] szerint.

Tubulin polimerizációs vizsgálat:

Azt a potenciált, amellyel az 1 vegyület és a paclitaxel a borjúagyból nyert tubulint polimerizálja, az [5,6] irodalom szerint vizsgálták.

Állatok:

Az összes rágcsálót a Harlan Sprague Dawley Co. (Indianapolis, Indiana) cégtől szereztük be, és ammóniamentes környezetben tartottuk meghatározott patogénmentes kolóniában. A Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute állatgondozási programját az American Association for Accreditation of Laboratory

Animal Care (AAALAC) Szövetség teljes mértékben jóváhagyta.

In vivo antitumor vizsgálat:

A következő humán tumorokat alkalmazták: A2780 petefészek, A2780Tax petefészek (Sr. Antonio Fojo, Medicine Branch, NCI, Bethesda, MD sejtekből), HCT116/VM46 vastagbél, Pat-7 petefészek /Dr. Thomas Hamilton, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA tumorbiopsziából/, olyan betegtől, aki TAXOL®-ra rezisztens volt). M5076 patkány/egér fibroszarkóma sejteket szintén felhasználtak.

A humán tumorokat Balb/c nu/nu meztelen egérben tartották fenn. Az M5076-ot C57BL/6 egérben tartották fenn. A tumorokat szubkután beültetések formájában tenyésztették a megfelelő egérfajtában donor egérből vett tumorrészek felhasználásával.

A következő tumorokat átvitték a jelzett egér gazdafajtában: patkány/egér M5076 fibroszarkóma (M5076) C57Bl/6 egérben; humán A2780 és Pat-7 petefészek karcinóma HCT116, HCT116/VM46 és LS174T vastagbél karcinóma, Pat-21 mellkarcinóma meztelen egérben. A tumorátvitel kéthetente történt a patkány/egér tumoroknál és körülbelül két-nyolc hetente a különböző humán tumorvonalak esetében. A hatékonysági vizsgálatok esetében az M5076 tumorokat (C57Bl/6 x DBA/2)F1 hibrid egerekbe, a humán tumorokat meztelen egérbe ültették be. Az összes tumorbeültetés hatékonysági vizsgálathoz szubkután (sc) történt.

A megfelelő válasz eléréséhez szükséges számú állatot a kísérlet kezdetén összegyűjtötték, mindegyiknek szubkután beültették a tumorfragmenset (* 50 mg) 13-as trokárral. A korai stádiumban levő tumorok kezelésére az állatokat ismét összesítet-

ték, majd szétosztották őket különböző kezelési és kontrollcsoportokba. A előrehaladott betegségben szenvedő állatok kezelésére a tumorokat előre meghatározott méretűre hagyták nőni (a tartományon kívül eső tumorokat kizárták a vizsgálatból), majd az állatokat egyenletesen szétosztották a különböző kezelésekre és kontrollcsoportokba. Az egyes állatok kezelése testtömegük alapján történt. A kezelt állatokat naponta ellenőrizték a kezelés toxicitása/elhalálozás szempontjából. Az egyes állatcsoportokat megmérték a kezelés előtt (Wt1), majd az utolsó kezelési dózis után (Wt2). A testtömeg különbség (Wt2-Wt1) megadja a kezeléssel kapcsolatos toxicitás mértékét.

A tumorválaszt heti kétszer határozták meg a tumor mérésével, amíg a tumorok elérték az előre megadott 1 gm "cél" méretet. A tumortömeget (mg) a következő képlettel értékelték:

$$\text{Tumortömeg} = (\text{hosszúság} \times \text{szélesség}^2) \div 2$$

A tumorelles hatást a maximálisan tolerált dózis (MTD) alapján értékelték, amelyet a kifejezett toxicitás megjelenése előtt közvetlenül mért dózisszint alapján határoztak meg (vagyis amikor egynél több elhullás történt). Az MTD gyakran azonos volt az OD értékkel. Feljegyezték az állatok elpusztulásának napját. Amikor a kezelt egerek azelőtt pusztultak el, hogy a tumor elérte volna a célméretet, úgy vették, hogy a gyógyszer toxicitása miatt pusztultak el. Egyetlen kontrollgér se pusztult el a célméret elérése előtt. A gyógyszer toxicitása miatt okozott egynél több elpusztulással jellemezhető kezelési csoportok esetében úgy tartották, hogy kifejezetten toxikus volt a kezelés, és ezeket az adatokat nem vették be a vegyület tumorelles hatásának ér-

tékelésébe.

A tumorválasz végpontját a tumornövekedés késése (T-C érték) kifejezéssel fejezték ki, amelyet a kezelt tumorok (T) előre megadott célméret eléréséhez szükséges idő (napok) számának és a kontrollcsoport azonos adatának (C) különbsége alapján határoztak meg.

A tumorsejt okozta elhullás értékelésére a tumortérfogat megkétszereződési idejét a következő képlettel számolták ki:

TVDT = a kontrolltumorok célméretének eléréséhez szükséges közepes idő (napokban) - a kontrolltumorok fél célméretének eléréséhez szükséges közepes idő (napokban); és

$$\text{Log sejtelhalás} = T - C + (3,32 \times \text{TVDT})$$

Az adatok statisztikai értékelését Gehan féle általános Wilcoxon vizsgálattal végezték [7].

1. példa (referencia):

Az 1 vegyület citotoxicitást mutat a rákos sejtekkel szemben in vitro

Az 1 vegyületnek széles spektrumú hatása van egy tumorsejtvonal csoporttal szemben in vitro. A vizsgált 21 sejtvonalból (1. ábra) 18-nak 1,4-6 nM között van az IC₅₀ értéke. Három sejtvonal IC₅₀ értéke nagyobb, mint 6 nM, ezek a következők: két erősen multigyógyszer-rezisztens (MDR) vastagbél-tumor vonal - HCT116/VM46 (24,5 nM) és MIP (24,8 nM), és a normál egér tüdő fibroblaszt sejtvonal MLF (34,5 nM). Megjegyzendő, hogy az 1 vegyület nagy mértékben "felülkerekedett" a multi-gyógyszerrezisztencián, amely ezeknek a sejtvonalaknak az elválaszthatatlan tulajdonsága. Így a paclitaxel esetében a sejtnövekedés 50%-os nö-

vekedéséhez szükséges koncentrációarányok (R/S vagy rezisztencia arány) ezekben a rezisztens vonalakban összevetve az érzékeny HCT116 vonallal, 155 és >> 55 volt, a HCT116/VM46 és MIP esetében. Összehasonlításként az 1 vegyület R/S aránya sorrendben csak 9,4 és 9,5 volt (2. táblázat).

2. táblázat

**Az 1 vegyület és paclitaxel in vitro citotoxicitása
paclitaxel-érzékeny és -rezisztens tumorsejtvonalakban**

| Vegyület | IC ₅₀ , nM (rezisztencia arány) | | |
|------------|--|-------------|------------------|
| | HCT-116 | HCT116/VM46 | MIP |
| Paclitaxel | 2,1 | 326 (155) | >> 112 (>>53) |
| 1 vegyület | 2,6 | 24,5 (9,4) | 24,8 (9,5) |

A citotoxicitás mechanizmusa - tubulin polimerizáció

Az epotilonok citotoxikus hatása, mint a taxánoké is, összekapcsolható a mikrotubulusok stabilizálásával, amely a mitózis blokkolásában nyilvánul meg a G2/M átmenetnél. Ebben a vonatkozásban az 1 vegyület hasonló természetes analógjaihoz, az epotilon A-hoz és epotilon B-hez (3. táblázat).

3. táblázat
Három epotilon tubulinpolimerizációs potenciálja
a paclitaxelhez viszonyítva

| Analóg | Polimerizációs po- tenciál, $EC_{0,01}$ (μM) | Az analóg/paclitaxel po- limerizációs potenciál aránya |
|--------------|--|--|
| 1 vegyület | 3,5 | 0,4 |
| (Epotilon A) | 2,0 | 0,4 |
| (Epotilon B) | 1,8 | 0,3 |
| Paclitaxel | 8,5, 5,0, 6,0 | 1,0 |

2. példa (referencia):

Az 1 vegyület gátolja a sejtciklus progressziót

A paclitaxelhez hasonlóan az 1 vegyület blokkolja a sejteket a sejtosztódási ciklus mitotikus fázisában. Sőt, az 1 vegyületnek a sejtmitózis blokkolásához szükséges koncentrációja jól egyezik a sejtpusztításhoz szükséges koncentrációval ugyanazon kezelés alatt. Tehát amint a 2. ábrán látható, az 1 vegyület az IC_{50} értékhez közeli koncentráció mellett (* 7,5 nM) csaknem teljesen blokkolja a sejteket a mitózisban 8 órán belül.

3. példa:

Kombinációs kemoterápia in vitro

Valamely rákellenes szer sikere nemcsak saját tumorellenes hatásától függ, hanem más antineopláziás gyógyszerekkel való sikeres kombinálódási képességétől is. Ahogy a paclitaxel, az 1 vegyület is komoly zavart vált ki a sejtciklusban a sejtek blokkolásával a mitózisban. Ezért igen célszerű megvizsgálni az 1 vegyület viselkedését kombinációs kemoterápiában való alkalmazás-

kor. A kolóniaképzési vizsgálatokkal tanulmányozták az 1 vegyület citotoxicitását néhány kiválasztott, különböző hatásmechanizmusú rákellenes szerrel való kombinációban, in vitro.

Az izobologram elemzések azt mutatták, hogy az 1 vegyület kölcsönhatásának módja más citotoxikus szerekkel in vitro gyógyszer-, szekvencia- és dóziszfüggő, és a szinergizmustól az antagonizmusig változhat (4. táblázat).

A paclitaxel esetében mind a három kezelési sorrendnél additivitást tapasztaltak. A Cisplatin esetében additivitást tapasztaltak, amikor a két szert egymást követően alkalmazták, a párhuzamos kezeléskor azonban szinergizmust figyeltek meg.

4. táblázat

A hatóanyag-expozíció sorrendjének hatása a citotoxikus kölcsönhatásra az 1 vegyület és öt másik antineopláziás szer között HCT116 humán vastagbél karcinóma sejtvonalakban

| Kombinációs sorrend | Kölcsönhatás módja |
|-----------------------------|--------------------|
| + Cisplatin (DNA károsítás) | |
| 1 vegyület → Cisplatin | Additivitás |
| Cisplatin → 1 vegyület | Additivitás |
| Párhuzamos | Szinergizmus |

4. példa (referencia):

Tumorellenes hatás parenterális adagolásakor

Az 1 vegyületet nyolc humán és patkány/egér tumormodellel vizsgálták. Ötöt paclitaxellel szemben mutatott rezisztenciájuk miatt választottak ki (5. táblázat) és három paclitaxelre érzé-

keny modellt vettek be, hogy az 1 vegyület tumorellenes hatásának teljes spektrumát értékelni lehessen.

Paclitaxellel szemben ellenálló tumormodellek

1. Pat-7 klinikailag előállított Taxol®-rezisztens petefészek karcinóma modell

Ezt a tumormodellt petefészekrákos beteg tumorbiopsziájával nyerték (Pat-7), a beteg kezdetben reagált a Taxol®-os kezelésre, de kilenc Taxolos monoterápiás menet után végül rezisztens lett. A Taxol®-os kezelések előtt a Pat-7 modellt számos egyéb kemoterápiás szerrel kezelték, köztük Carboplatint, Cytosant, VP-16-ot, Ifosfamide-ot és Altretamine-t alkalmaztak. A tumorbiopsziát a TAXOL® rezisztencia kialakulása után végezték.

Az 1 vegyületet tumorméret-meghatározáson átment meztelen egereknek adták be kétnaponként 5-ször. Optimális dózis mellett jelentős mértékű reakciót tapasztaltak - 2,1 és 4,5 LCK - két külön vizsgálatban (6. táblázat és 4. ábra). Egyidejűleg értékelték az IV paclitaxelt, sorrendben 0,6 és 1,3 LCK-t kaptak, optimális dózis és ütemezés mellett.

Az 1 vegyület egy másik fajtában való értékelésére, Pat-7-et ültettek be immunokompromittált meztelen patkányba, és az 1 vegyületet IV adták be, minden nyolc napban kétszer (6. táblázat). 3 mg/kg/inj. optimális dózis mellett az 1 vegyület igen hatásos volt, 4-6 gyógyulás történt. Összehasonlításként a paclitaxel 2,2 LCK értéket adott optimális dózis mellett, és nem volt gyógyulás (n=6).

2. A2780Tax humán petefészek karcinóma xenograft (mutált tubulin)

Az A2780Tax paclitaxellel szemben rezisztens humán petefé-

szek karcinóma modell. Érzékeny szülő A2780 vonalból nyerték sejtek paclitaxellel és verapamillal, egy MDR-érvénytelenítő szerrel való koinkubálásával. Rezisztencia mechanizmusa nem MDR-től függő, és a béta-tubulin proteint kódoló gén mutációjával magyarázható [2].

Az **1** vegyületet tumorméret-meghatározáson átment egereknek adták be kétnaponként 5-ször, így 2,5 LCK-t kaptak az MTD-nél (6,3 mg/kg/inj.). Összehasonlításként az IV paclitaxel 0,8 LCK-t adott az MTD-nél. Az **1** vegyület ebben a vizsgálatban sokkal jobb, mint a paclitaxel (6. táblázat).

3. *HCT116/VM46 humán vastagbél karcinóma xenograft (multidrug-rezisztens)*

A HCT116/VM46 egy MDR-rezisztens vastagbél karcinóma, amelyet érzékeny HCT116 szülői vonalból nyertek. In vivo tenyésztették meztelen egérben, a HCT116/VM46 konzisztensen nagy rezisztenciát mutat paclitaxelra (5. táblázat). 12 egymást követő vizsgálatban a paclitaxel az MTD értéknél alacsony LCK-t mutatott, amely 0-0,9 között volt (közepes = 0,35 LCK).

A tumorméret-meghatározáson átment, HCT116/VM46 tumoros egerek kezelése **1** vegyülettel 2 naponként 5-ször jelentős tumorellenes hatást váltott ki. Az **1** vegyület optimális dózisa (4,8-6,3 mg/kg/inj.) három külön vizsgálatban 3,1, 1,3 és 1,8 LCK-t adott. Ezzel szemben az egyidejűleg vizsgált IV paclitaxel az MTD-nél sorrendben 0,4 és 0,7 LCK-t adott az első két vizsgálatban.

4. *Pat-21, klinikailag létrehozott paclitaxel-rezisztens mellrák modell*

A Pat-21 korai átvitelű paclitaxel-rezisztens tumormodell, amelyet metasztatizos mellrákos beteg tumorbiopszájával nyertek, a beteg nem reagált a kísérleti terápiára, amely 5 ciklus Taxol® és multigyógyszer-rezisztens érvénytelenítő szer, Dexverapamil kombinált adagolásából állt. A TAXOL® terápia előtt a beteg kemoterápiás kezelést kapott, amely Adriamycinből, Cytosanból, Methotrexate-ből és 5-FU-ból állt. A tumorbiopsziát a TAXOL® terápia megállítása után végezték.

A Pat-21 növekedés viszonylag lassú ütemű volt meztelen egérben, a térfogat körülbelül háromhetenként megkettőződött. A tumorelleses hatás értékelése céljából két menetben 1 vegyületet vagy paclitaxelt adtak a tumorméret-meghatározás szerint körülbelül 100 mg-os Pat-21 tumoros egérnek. A két menetet 3 hetes szünet szakította meg. A menetek során 3 dózist adtak minden négy napban. A paclitaxel teljesen inaktív volt a modellel szemben, az LCK 0,3 volt az MTD-nél 36 mg/kg/inj. esetén. Ezzel szemben az 1 vegyület igen hatásos volt, optimális 10 mg/kg/inj. dózis mellett az LCK érték >1,5.

5. M5076 egér szarkóma modell

Az M5076 egér fibroszarkóma, amely eredendően rezisztens a Paclitaxelre in vivo. Az 1 vegyületet IV vizsgálták kétnaponként 5-szöri ütemezésben méretmeghatározáson át nem ment sc tumorokkal összevetve, így inaktív volt MTD 8,4 mg/kg/inj. mellett, sorrendben 0,5 és 0,7 LCK értéket adott két külön kísérletben (6. táblázat). Egyidejűleg vizsgálták az IV paclitaxelt is, optimális ütemezésben, ez szintén hatástalan volt, sorrendben 0,1 és 0,5 LCK értéket adott.

Egy külön vizsgálatban az 1 vegyületet kevésbé gyakori dózisütemezésben adagolták (vagyis négynaponként háromszor), így fokozódott a tumorelles hatás, az LCK érték 1,0 volt MTD-nél 24 mg/kg/inj. mellett.

5. táblázat

Tumormodell jellemzők

| Tumor | Hisztológia | Paclitaxel érzékenység | Rezisztencia mechanizmus(ok) |
|-------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| Humán | | | |
| Pat-7 | Petefészek | Rezisztens ¹ | MDR, MRP ² |
| A2780Tax | Petefészek | Rezisztens | Tubulin mutáció |
| HCT116/VM46 | Vastagbél | Rezisztens | MDR |
| Pat-21 | Mell | Rezisztens ¹ | Ismeretlen |
| A2780 | Petefészek | Érzékeny | - |
| HCT116 | Vastagbél | Érzékeny | - |
| LS174T | Vastagbél | Érzékeny | - |
| Rágcsáló | | | |
| M56076 | Fibroszarkóma | Rezisztens | Ismeretlen, nem MDR |

¹ - Klinikai rezisztencia TAXOL-lal szemben

² - MRP = multidrug-rezisztencia protein

6. táblázat

Az 1 vegyület és paclitaxel preklinikai tumorellenes hatása
paclitaxel-rezisztens tumorokkal szemben

| Tumor | 1 vegyület | | | | Paclitaxel |
|---|------------|------------------------|----------------------------|--|---|
| | Sorszám | Rt., Ütemezés | OD ¹ (mg/kg) | LCK ² (gyógyulás/összes) | LCK ^{2,3} |
| Humán tumorok - meztelen egerekben | | | | | |
| Pat-7 | R403 | IV, q2dx5 | 4,8 | 2,1 | 0,6 |
| | 8 | IV, q2dx5 | 6,3 | 4,5 | 1,3 |
| | 12 | IV, q2dx5 | 6,3 | 2,1 | |
| A2780Tax | 12 | IV, q2dx5 | 6,3 | 2,5 | 0,8 |
| HCTVM46 | 32 | IV, q2dx5 | 4,8 | 3,1 | 0,4 |
| | 33 | IV, q2dx5 | 4,8 | 1,3 | 0,7 |
| | 35 | IV, q2dx5 | 6,3 | 1,8 | ND ⁴ |
| | 35 | IV, q2dx5 | 16 | 2,0 | ND ⁴ |
| Körtörténeti paclitaxel válaszok 12 egymást követő vizsgálatban | | | | | (0,4, 0,7 0,4 0,3 0,3 0,0 0,2 0,1 0,9 0,9 0,3 0,3) |
| Pat-21 | R667 | IV, q4dx3; 41,68 | 10 | >1,5 ⁵ | 0,3 |
| Humán tumorok - meztelen patkányokban | | | | | |
| Pat-7 | 15 | IV, q8dx2 | 3 | >5 (4/6) | 2,2 (0/6) |
| Rágcsáló tumorok | | | | | |
| M5076 | 159 | IV, q2dx5 | 8,4 | 0,5 | 0,1 |
| | 162 | IV, q2dx5 | 8,4 | 0,7 | 0,5 |
| | 172 | IV, q4dx3 | 24 | 1,0 | ND |
| ¹ OD - optimális dózis vagy maximális tolerált dózis (MTD) | | | | | |
| ² LCK - összes log sejtelhalás. Ha a kezelt állatok 50%-a vagy több meggyógyul, az LCK értéket a gyógyulás előtti utolsó tumormérésből számolják ki, és ez minimum becslést jelent (>). Ilyen esetekben a gyógyult arányt is megadják. | | | | | |
| ³ LCK - az optimális dózusra (a dózis 24-36 mg/kg/inj.), vagy a legnagyobb vizsgált dózusra inaktivitás esetén. | | | | | |
| ⁴ ND - nem határoztuk meg | | | | | |
| ⁵ - A vizsgálat még folyik. Előzetes elemzés a tumormérési adatok alapján a legutolsó adatok szerint (1999.08.06): a tumornövekedés késése egyenlő legalább 1,5 LCK értékkel. | | | | | |

Paclitaxelra érzékeny tumormodellek

1. A2780 humán petefészek karcinóma modell

Az A2780 egy gyorsan növekvő humán petefészek karcinóma modell, amely igen érzékeny paclitaxelra (6. táblázat). Tumor-méret-meghatározáson átment meztelen egereket 1 vegyülettel kezelték, "paclitaxelra optimált ütemezés" szerint, IV adagolással, kétnaponként összesen 5 injekcióval (minden két napban x 5). A maximális tolerált dózis mellett (6,3 mg/kg/inj.) az 1 vegyület igen hatásos volt, >4,8, 2 és 3,1 LCK értéket kaptak három külön kísérletben. Egyidejűleg vizsgálták IV paclitaxelt a két első vizsgálatban, sorrendben 2 és 3,5 LCK értéket kaptak az optimális dózis esetén.

Meztelen egerekben tenyésztett A2780-at szintén alkalmaztak. Az 1 vegyület MTD értékénél vizsgálva (1,2 mg/kg/inj.) és kétnaponként 5-ször adva hatástalannak bizonyult (0,3 LCK érték). Egyidejűleg vizsgálták az IV paclitaxelt, ez igen hatásos volt, az adott vizsgálat 7 gyógyulásából 5-öt adott. A következő vizsgálat egérben A2780 tumorról azt mutatta, hogy az 1 vegyület kevésbé gyakori adagolását jobban viselték, és jobb volt a hatásosság (6. táblázat). Tehát az 1 vegyület hatásosságának hiánya meztelen egérben az alkalmazott szuboptimális kezelési ütemezéssel magyarázható. Például egy következő vizsgálatban, ahol paclitaxel-rezisztens Pat-7 tumorokat alkalmaztak, az 1 vegyület jelentős tumorelleses hatást mutatott, ha kevésbé gyakran, nyolc naponta kétszer adagolták (6. táblázat).

2. HCT116 humán vastagbél karcinóma modell

A HCT116 humán vastagbél karcinóma modell, amely igen érzé-

keny paclitaxelra in vivo. Az 1 vegyületet tumorméret-meghatározáson átment (≈ 100 mg) HCT116 tumoros meztelen egereknek adták be, igen hatásos volt, az LCK érték $>6,3$ volt, és számos gyógyulást figyeltek meg három különböző kezelési ütemezésnél: kétnaponként 5 dózis, négynaponként 3 dózis és nyolcnaponként 2 dózis (7. táblázat). Bár ezek az aktivitások jelentősek és hasonló mértékűek, nem jobbak, mint a paclitaxelra kapott hisztológiai eredmények, amelyeket a paclitaxel optimális dózisára és ütemezésére kaptak.

3. LS174T

Az LS174T humán vastagbél karcinóma modell, amely érzékeny paclitaxelra. Az 1 vegyületet négynaponként 3 dózisban adva 2,3 LCK értéket kaptak 16 mg/kg/inj. MTD érték mellett. Összehasonlításként egyidejűleg vizsgálták az iv Paclitaxelt, így 2,0 LCK értéket kaptak optimális 36 mg/kg/inj. mellett, kétnaponként 5 dózis adagolása esetén (7. táblázat).

7. táblázat

Az 1 vegyület és paclitaxel preklinikai tumorellenes hatása
paclitaxel-érzékeny tumoroknál

| Tumor | 1 vegyület | | | | Paclitaxel |
|---|------------|------------------|----------------------------|---|--------------------|
| | Sorszám | Rt., ütemezés | OD ¹ (mg/kg) | LCK ² (gyógyu- lás/összes) | LCK ^{2,3} |
| <i>Humán tumorok - mestelen egerekben</i> | | | | | |
| A2780 | 89 | IV, q2dx5 | 6,3 | >4,8 (3/7) | 2 |
| | 92 | IV, q2dx5 | 6,3 | 2 | 3,5 |
| | 111 | IV, q2dx5 | 4,8 | 3,1 | ND ⁴ |
| | 115 | IV, q2dx5 | 6,3 | 2,4 | ND |
| | 115 | IV, q4dx3 | 16 | >5,3 | ND |
| HCT116 | 52 | IV, q2dx5 | 6,3 | >6,3 (4/8) | ND |
| | 52 | IV, q4dx3 | 10 | >6,3 (5/8) | ND |
| | 52 | IV, q8dx2 | 24 | >6,3 (8/8) | ND |
| LS174T | R578 | IV, q4dx3 | 16 | 2,3 | 2,0 |

¹ OD - optimális dózis vagy maximális tolerált dózis (MTD).

² LCK - összes log sejtelhalás. Ha a kezelt állatok 50%-a vagy több meggyógyul, az LCK értéket a gyógyulás előtti utolsó tumormérésből számolják ki, és ez minimum becslést jelent (>). Ilyen esetekben a gyógyult arányt is megadják.

³ LCK - az optimális dózusra (a dózis 24-36 mg/kg/inj.), vagy a legnagyobb vizsgált dózusra inaktivitás esetén.

⁴ ND - nem határozták meg

5. példa (referencia):**Tumorelleses hatás orális beadás esetén**

Az a tény, hogy az 1 vegyület jóval stabilabb semleges pH mellett, mint alacsony pH-értéknél, azt az ötletet adta, hogy kipróbálják az 1 vegyületet orálisan (PO) pH-puffer vivőanyagban (0,25 M kálium-foszfát, pH = 8,0). Kétnaponként 5 dózist alkalmazva az 1 vegyület igen hatékony volt orálisan a Pat-7 humán petefészek karcinóma modell ellen (8. táblázat). Két külön vizsgálatban az orálisan adott 1 vegyülettel 3,1 és 2,5 LCK értéket kaptak MTD érték esetén (5. ábra és 8. táblázat). Összehasonlításként egyidejűleg vizsgálták az IV paclitaxelt, sorrendben 1,3 és 1,2 LCK értéket kaptak, optimális dózis és ütemezés mellett.

A HCT116 humán vastagbél karcinóma modellben orálisan adott 1 vegyülettel nyolcból hét egér meggyógyult, amikor 90 mg/kg/beadás dózist kaptak, kétnaponként öt dózisban. Megjegyzendő, hogy a tumorelleses hatás foka azonos volt azzal, amelyet az egyidejűleg vizsgált legjobb IV rezsimmel kaptak (nyolcnaponként 2 dózis, 6. táblázat).

8. táblázat

Orálisan adott 1 vegyület és IV paclitaxel tumorelles hatása

| Tumor | 1 vegyület (PO) | | | | Paclitaxel IV |
|--------|-----------------|------------------|----------------------------|---|--------------------|
| | Sorszám | Rt., ütemezés | OD ¹ (mg/kg) | LCK ² (gyógyu- lás/összes) | LCK ^{2,3} |
| Pat-7 | 8 | PO, q2dx5 | 60 | 3,1 | 1,3 |
| | 9 | PO, q2dx5 | 80 | 2,5 | 1,2 |
| HCT116 | 52 | PO, q2dx5 | 90 | >6,3 (7/8) | ND ⁴ |

¹ OD - optimális dózis vagy maximális tolerált dózis (MTD).
² LCK - összes log sejtelhalás. Ha a kezelt állatok 50%-a vagy több meggyógyul, az LCK értéket a gyógyulás előtti utolsó tumormérésből számolják ki, és ez minimum becslést jelent (>). Ilyen esetekben a gyógyult arányt is megadják.
³ LCK - az optimális dózusra (a dózis 24-36 mg/kg/inj.), vagy a legnagyobb vizsgált dózusra inaktivitás esetén.
⁴ ND - nem határozták meg.

Ütemezéstől való függőség

Több vizsgálatot folytattak az 1 vegyület ütemezéstől való függőségének értékelésére. Az első vizsgálatban A2780 tumorokat alkalmaztak, és az 1 vegyületet egereknek kétféle ütemezésben adták: 1) hagyományos (paclitaxelra optimalizált): kétnaponként 5 dózis, és 2) kevésbé gyakori adagolás: négynaponként 3 dózis. Bár a vegyület mindkét esetben hatásos volt, sorrendben 2,4 és >5,3 LCK értékeket kaptak, a kevésbé gyakori ütemezés nagyobb dózisszintet tett lehetővé (MTD = 16 mg/kg/inj.), és sokkal jobb teljesítményt nyújtott, mint a gyakoribb megoldás (MTD = 6,3 mg/kg/inj.) (6. ábra és 9. táblázat).

Egy második vizsgálatban HCT116 humán vastagbél karcinóma modellen háromféle kezelést alkalmaztak: q2dx5, q4dx3, valamint q8dx2 ütemezéseket. Az összes kezelés IV volt, a tumorok 100 mg-osak voltak a kezelés kezdetén. A legjobb eredményt a q8dx2 ütemezés mellett érték el. A 24 mg/kg/inj. optimális dózis mellett az 1 vegyület 100%-os gyógyítást ért el (8 egérből 8). A q4dx3 és a q2dx5 ütemezésekkel sorrendben nyolcból öt, illetve nyolcból négy egér gyógyult (9. táblázat).

Két másik vizsgálatban Pat-7 és HCT116/VM46 tumorokkal két IV kezelés hatékonyságát vetették össze: q2dx5 és q4dx3. A két rendszer mindkét esetben lényegében azonos tumorelles hatást mutatott (9. táblázat).

9. táblázat

Az 1 vegyület tumorelles hatásának függősége az adagolás ütemezésétől

| Tumor | 1 vegyület | | | |
|-------------|------------|------------------|----------------------------|--|
| | Sorszám | Rt., ütemezés | OD ¹ (mg/kg) | LCK ² (gyógyulás/összes) |
| A2780 | 115 | IV, q2dx5 | 6,3 | 2,4 (0/8) |
| | 115 | IV, q4dx3 | 16 | >5,3 (3/7) |
| HCT116 | 52 | IV, q2dx5 | 6,3 | >6,3 (4/8) |
| | 52 | IV, q4dx3 | 10 | >6,3 (5/8) |
| | 52 | IV, q8dx2 | 24 | >6,3 (8/8) |
| Pat-7 | 12 | IV, q2dx5 | 6,3 | 2,1 |
| | 12 | IV, q4dx3 | 15 | 1,7 |
| HCT116/VM46 | 35 | IV, q2dx5 | 6,3 | 1,8 |
| | 35 | IV, q4dx3 | 16 | 2,0 |

¹ OD - optimális dózis vagy maximális tolerált dózis (MTD).

² LCK - összes log sejtelhalás. Ha a kezelt állatok 50%-a vagy több meggyógyul, az LCK értéket a gyógyulás előtti utolsó tumormérésből számolják ki, és ez minimum becslést jelent (>). Ilyen esetekben a gyógyult arányt is megadják.

Az 1 vegyület nyilvánvalóan jobb tumorellenes hatást mutatott a paclitaxelnál öt paclitaxel-rezisztens tumorban - négy humán tumor xenograft és egy patkány/egér tumor esetében: klinikailag létrehozott paclitaxel-rezisztens Pat-7 petefészek karcinóma; A2780Tax petefészek karcinóma, amely tubulinmutáció következtében rezisztens a paclitaxelra, HCT116/VM46 MDR vastagbél karcinóma és klinikailag előállított paclitaxel-rezisztens Pat-21 mell karcinóma, valamint a patkány/egér M5076 fibroszarkóma esetében. Három paclitaxelra érzékeny humán tumor xenograft ellen az 1 vegyület ugyanolyan tumorellenes hatást mutatott, mint a paclitaxel: A2780 humán petefészek karcinóma; HCT116 és LS174T humán vastagbél karcinóma. Emellett az 1 vegyület orálisan hatásos, ugyanolyan tumorellenes hatást mutat orálisan, mint az IV gyógyszerbevitelnél két humán tumor xenograft esetén.

6. példa (referencia):

Az 1 vegyület farmakológiai vizsgálata külön és más antineopláziás szerekkel való kombinációban előrehaladott rákos betegekkel

Az 1 vegyület citotoxikus hatásának ismeretében in vivo és in vitro, a toxicitás értékelésére folyamatban vannak az 1. fázisú klinikai vizsgálatok előrehaladott rákban szenvedő betegekkel. A peritoneális petefészek rákban, nem-kissejtes tüdőrákban, melanómában és ismeretlen primer rákban szenvedő betegek esetében értékelik az objektív reakciót. Az 1 vegyületet növekvő dózisban adagolják 7,4 mg/m² és 65 mg/m² adag között. A vizsgálatok során kiderült az MTD. A 2. fázisú klinikai vizsgálatokhoz javasolt adag 50 mg/m² q3 hetí ütemezésben.

Az **1** vegyületet értékelték az 1. fázisú klinikai vizsgálatokban más terápiás szerekkel kombinálva is. Az **1** vegyületet 30 mg/m^2 kiindulási dózisban carboplatinnal 6 AUC mellett q3 heti adagolásban vizsgálták. További vizsgálatokat folytatnak 30 mg/m^2 **1** vegyület és 50 mg/m^2 doxorubicin kombinált adagolásával q3 heti ütemezésben. Folyamatban van a kombinációs kemoterápiás rendszer vizsgálata, ahol 30 mg/m^2 **1** vegyületet és 150 mg/m^2 CPT-11 vegyületet adagolnak.

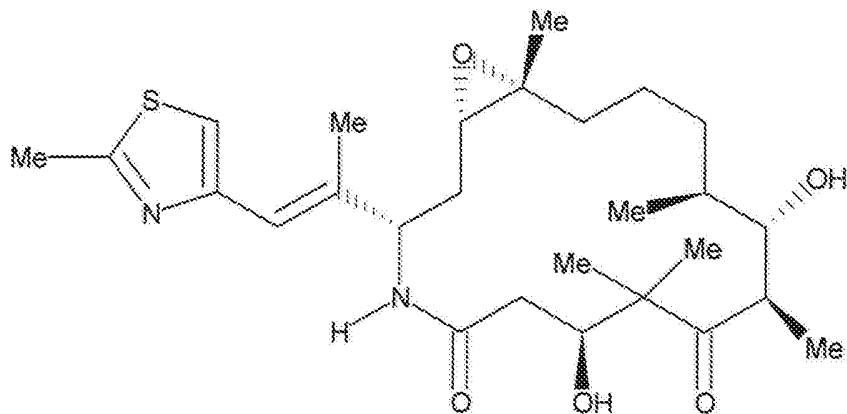
Az **1** vegyületet értékelik a 2. fázisú klinikai vizsgálatok során rákos betegeken, akik nem reagáltak taxánokra, antraciklinekre, platinára és 5 FU-ra CPT-11-gyel kombinálva. Ezekben a vizsgálatokban az **1** vegyületet 50 mg/kg/m^2 dózisban intravénásan adják be háromhetente 1 órán át, 18 ciklusban (PR és SD), vagy 4 ciklusban CR után.

HIVATKOZÁSOK:

- [1] Long, B. H. et al.; Cancer Research, **51**, 5275-5284 (1991)
- [2] Giannakakou, P. et al.; J. Biol. Chem., **272**, 27, 17118-25 (1997)
- [3] Riss, T. L. et al.; Molecular Biology of the Cell, 3, (különszám) 184a (1992)
- [4] Stephens, T. C.; Steel, G. G.; Rodent tumor models in experimental cancer therapy, szerk.: Robert, F. Kallman; Pergamon Press, NY. 248 oldal.
- [5] Long, B. H.; Fairchild, C. R.; Cancer Research, **54**, 16, 4355-4361 (1994)
- [6] Williams, R. C.; Lee, J. C.; Methods in Enzymology, **85**, (D rész), 376-385 (1982)
- [7] Gehan, G. A.; Biometrika, **52**, 203-233 (1985).

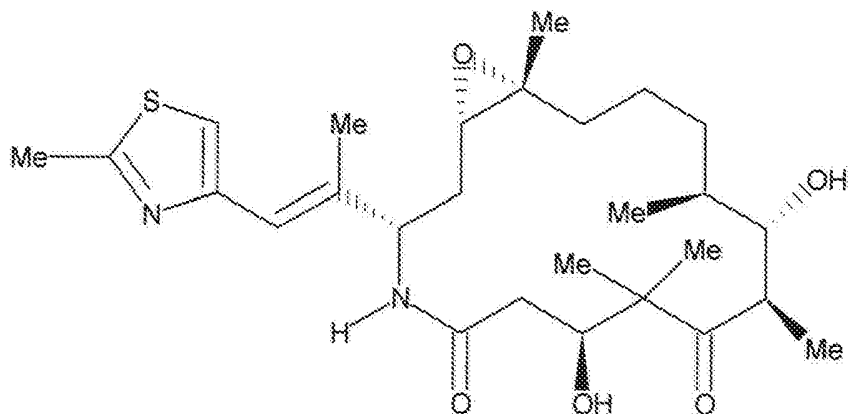
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Cisplatin és egy



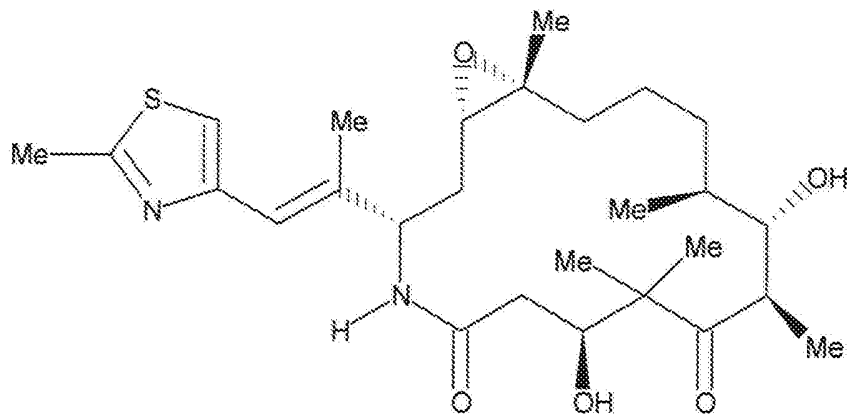
képletű vegyület gyógyászatban való alkalmazásra.

2. Cisplatin és egy



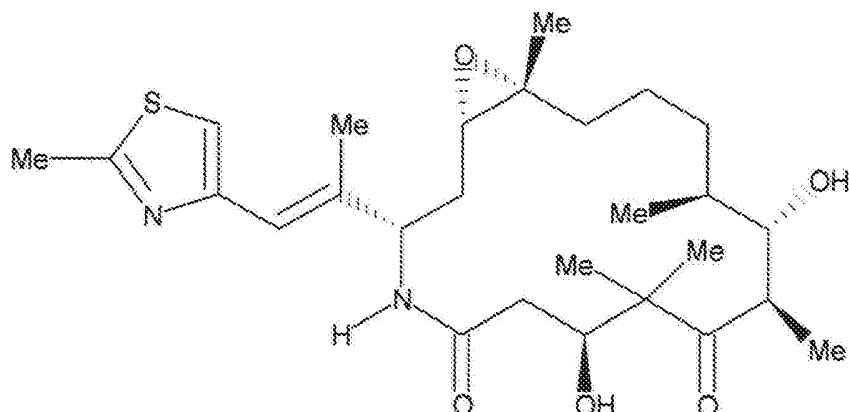
képletű vegyület rák kezelésében való alkalmazásra.

3. Cisplatin és egy



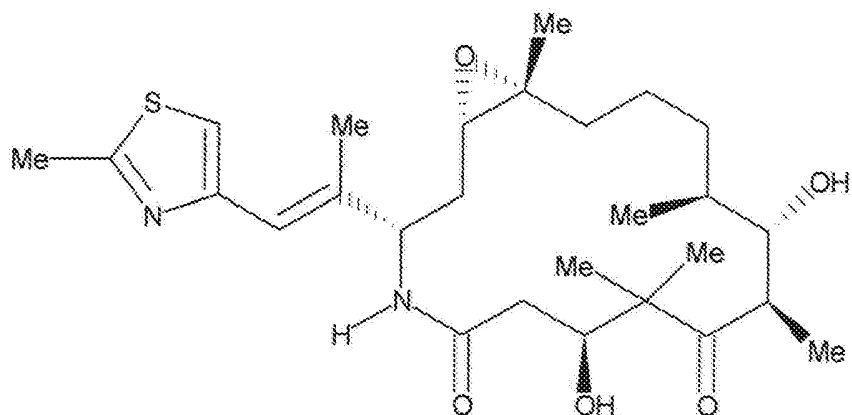
képletű vegyület alkalmazása rák kezelésére szolgáló gyógyszer gyártásában.

4. Az EGFR-re immunspezifikus C225 antitest és egy



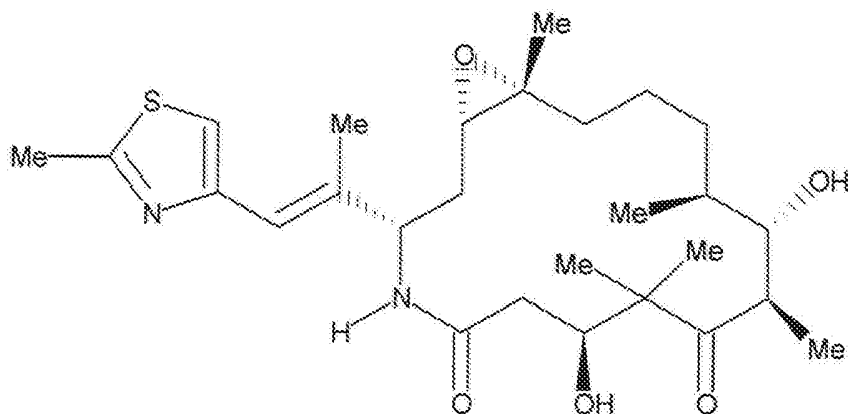
képletű vegyület gyógyászatban való alkalmazásra.

5. Az EGFR-re immunspezifikus C225 antitest és egy



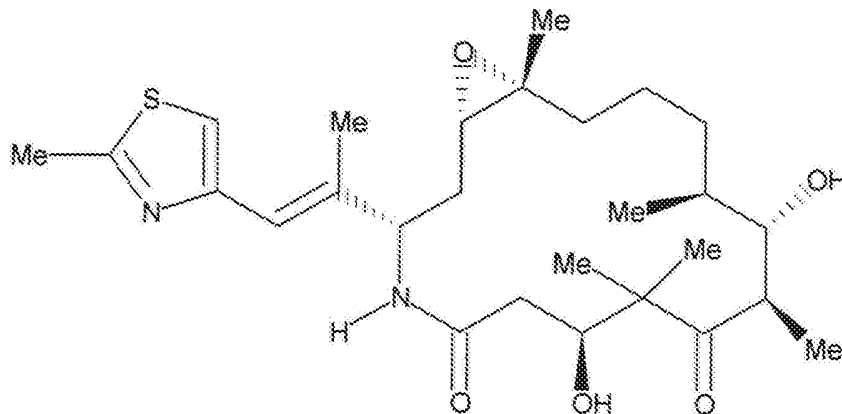
képletű vegyület rák kezelésében való alkalmazásra.

6. Az EGFR-re immunspezifikus C225 antitest és egy



képletű vegyület a húgyhólyag előrehaladott vagy áttétes rákjai, hasnyálmirigyrák, prosztatarák, nem-kissejtes tüdőrák, kolorektális rák vagy mellrák kezelésében való alkalmazásra.

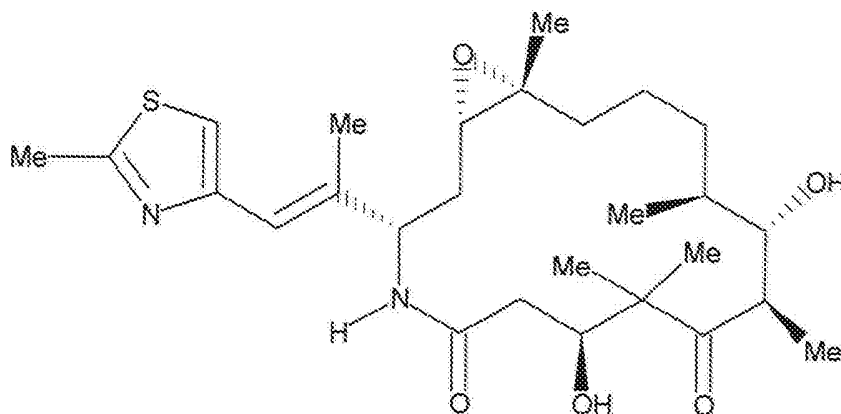
7. Az EGFR-re immunspecifikus C225 antitest és egy



képletű vegyület alkalmazása rák kezelésére szolgáló gyógyszer gyártásában.

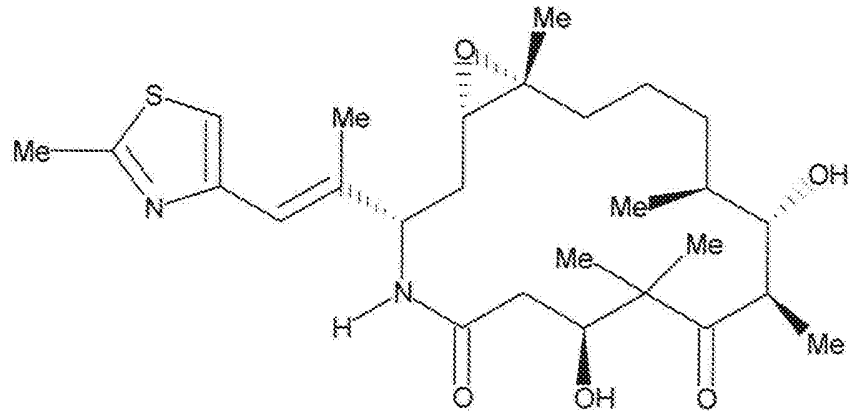
8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a rák a húgyhólyag előrehaladott vagy áttétes rákja, hasnyálmirigyrák, prosztatarák, nem-kissejtes tüdőrák, kolorektális rák vagy mellrák.

9. Egy anti-VEGF antitest, ZD6474 vagy SU6668 közül kiválasztott VEGF inhibitor és egy



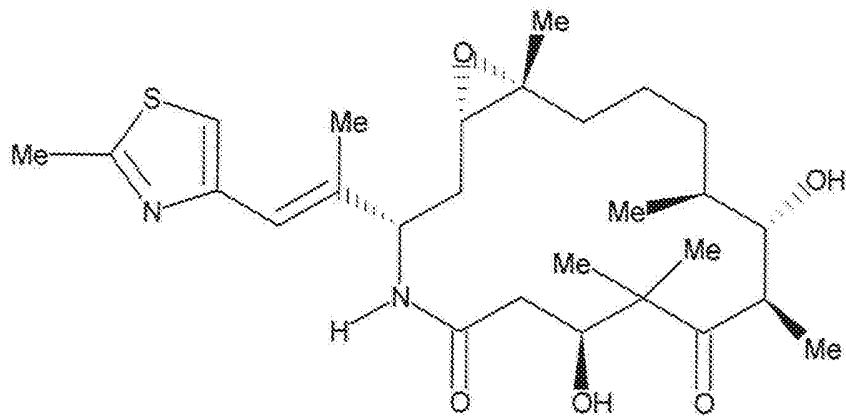
képletű vegyület gyógyászatban való alkalmazásra.

10. Egy anti-VEGF antitest, ZD6474 vagy SU6668 közül kiválasztott VEGF inhibitor és egy



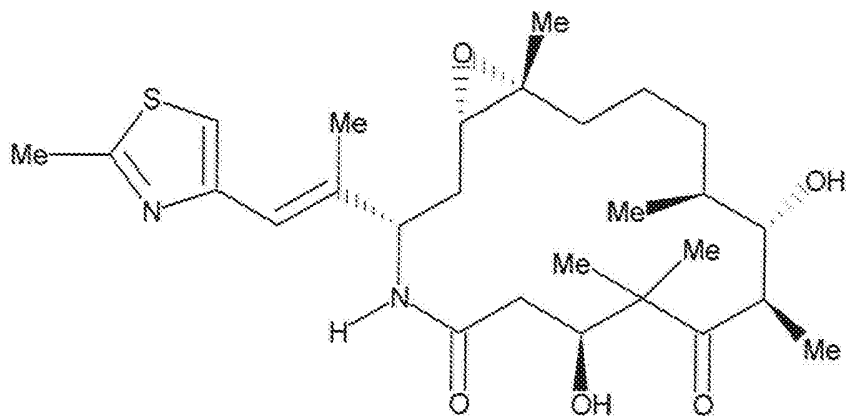
képletű vegyület rák kezelésében való alkalmazására.

11. Egy anti-VEGF antitest, ZD6474 vagy SU6668 közül kiválasztott VEGF inhibitor és egy



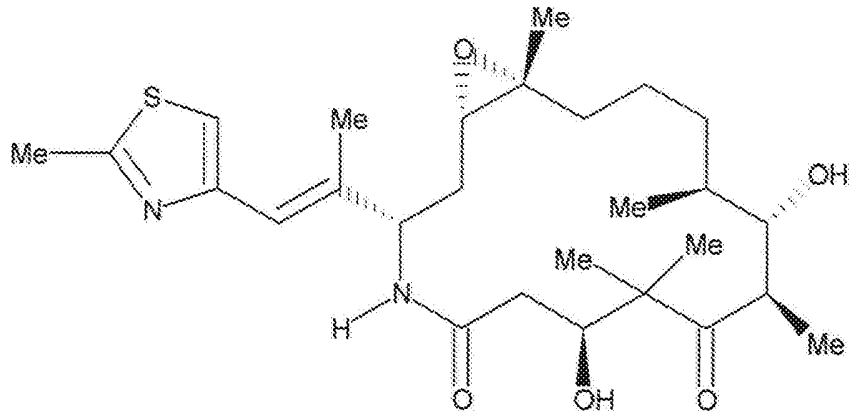
képletű vegyület alkalmazása rák kezelésére szolgáló gyógyszer gyártásában.

12. Capecitabin és egy



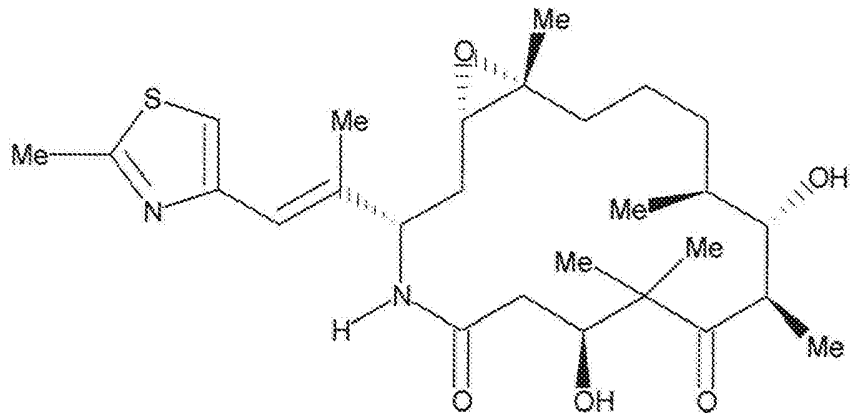
képletű vegyület gyógyászatban való alkalmazására.

13. Capecitabin és egy



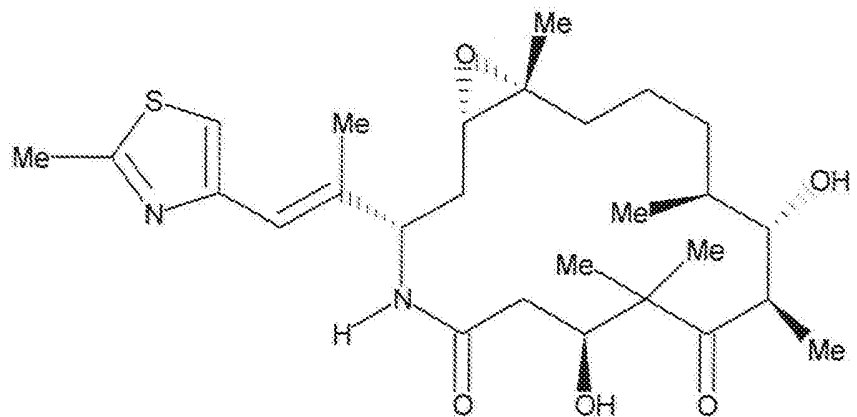
képletű vegyület rák kezelésében való alkalmazásra.

14. Capecitabin és egy



képletű vegyület alkalmazása rák kezelésére szolgáló gyógyszer gyártásában.

15. Gyógyszerészeti kompozíció rák kezelésére, amely magában foglal egy



képletű vegyületet és egy, a cisplatin, az EGFR-re immunspecifi-

kus C225 antitest, egy anti-VEGF antitest, ZD6474 vagy SU6668 közül kiválasztott VEGF inhibitor vagy capecitabin közül kiválasztott kemoterápiás szert.

A meghatalmazott:



Ráthonyi Zoltán
szabadalmi ügyvéd

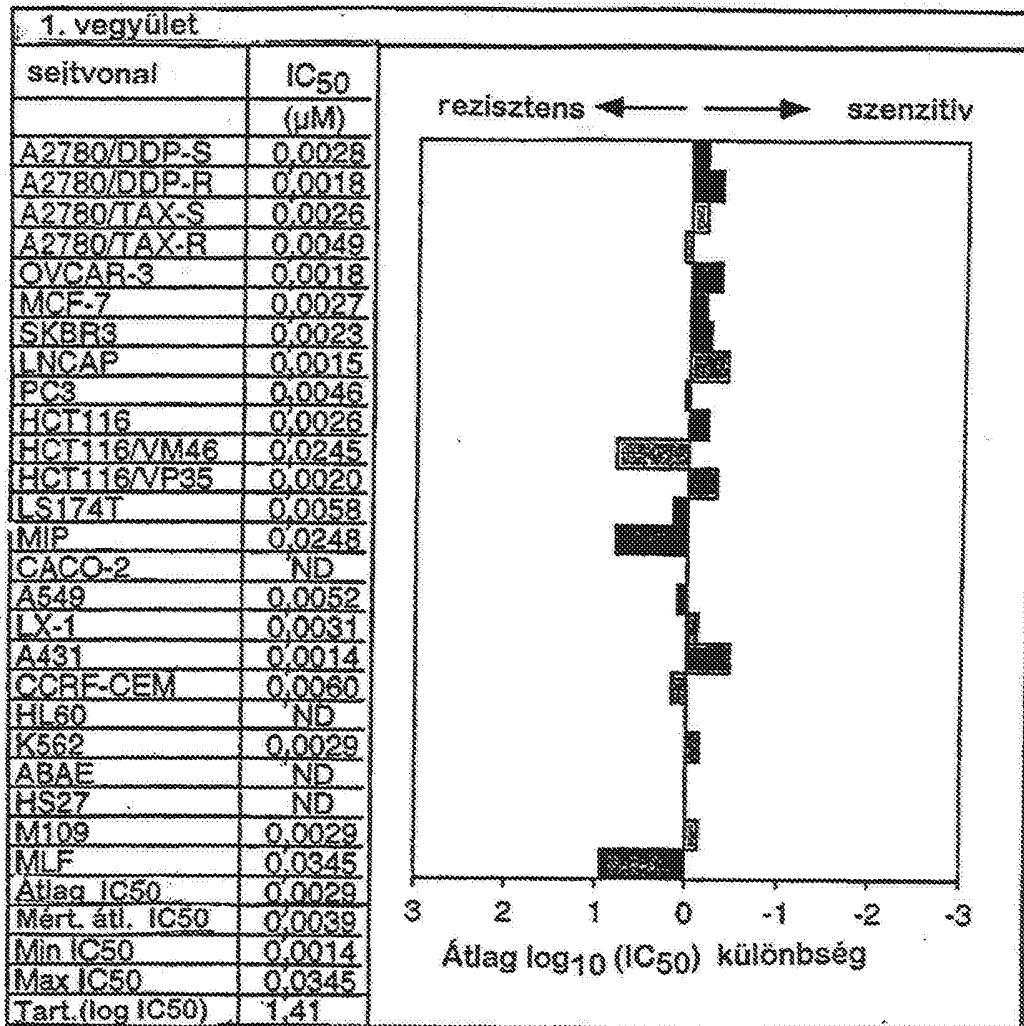
SOG Szabadalmi Ügyvédi Iroda

1057 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

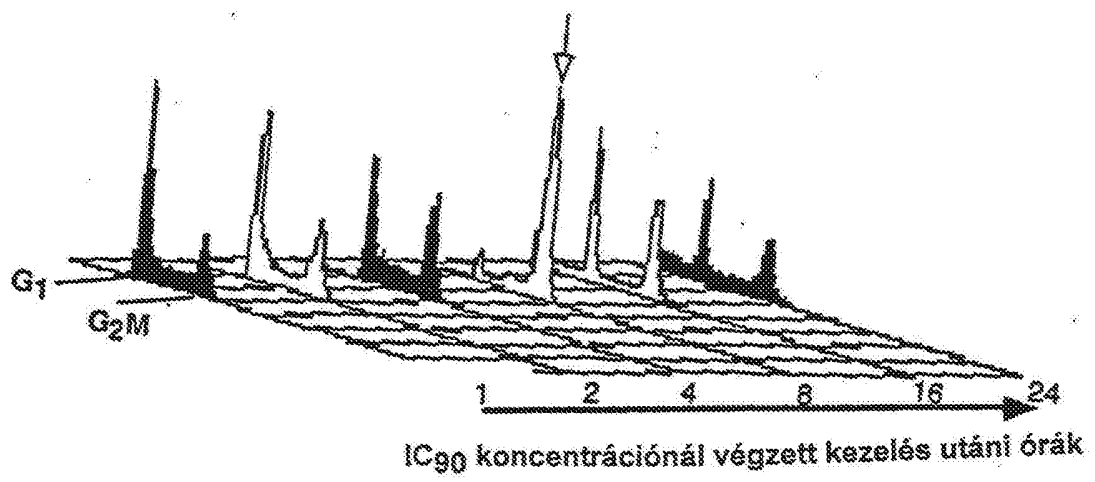
Email: raso@otyk.hu

1/5



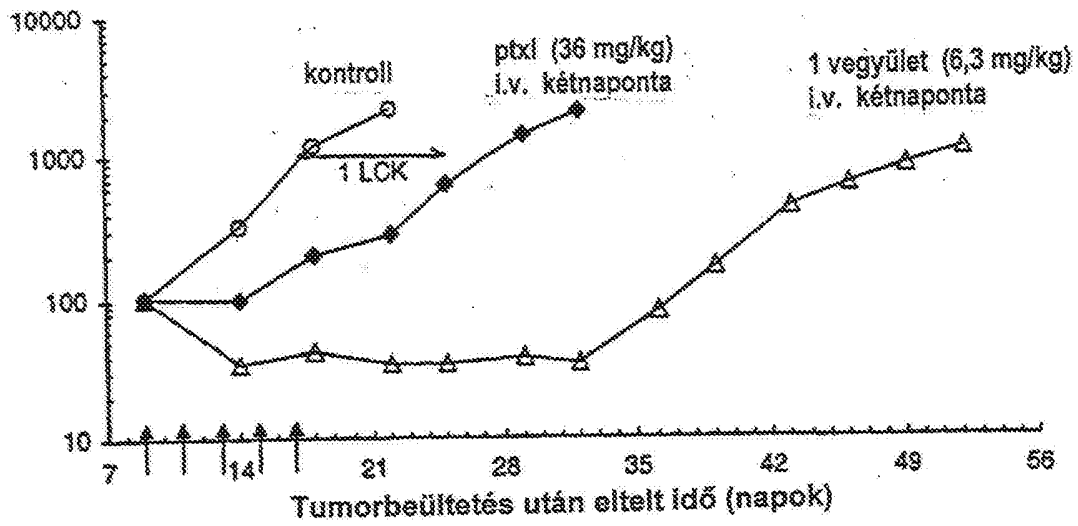
1. ábra

2/5

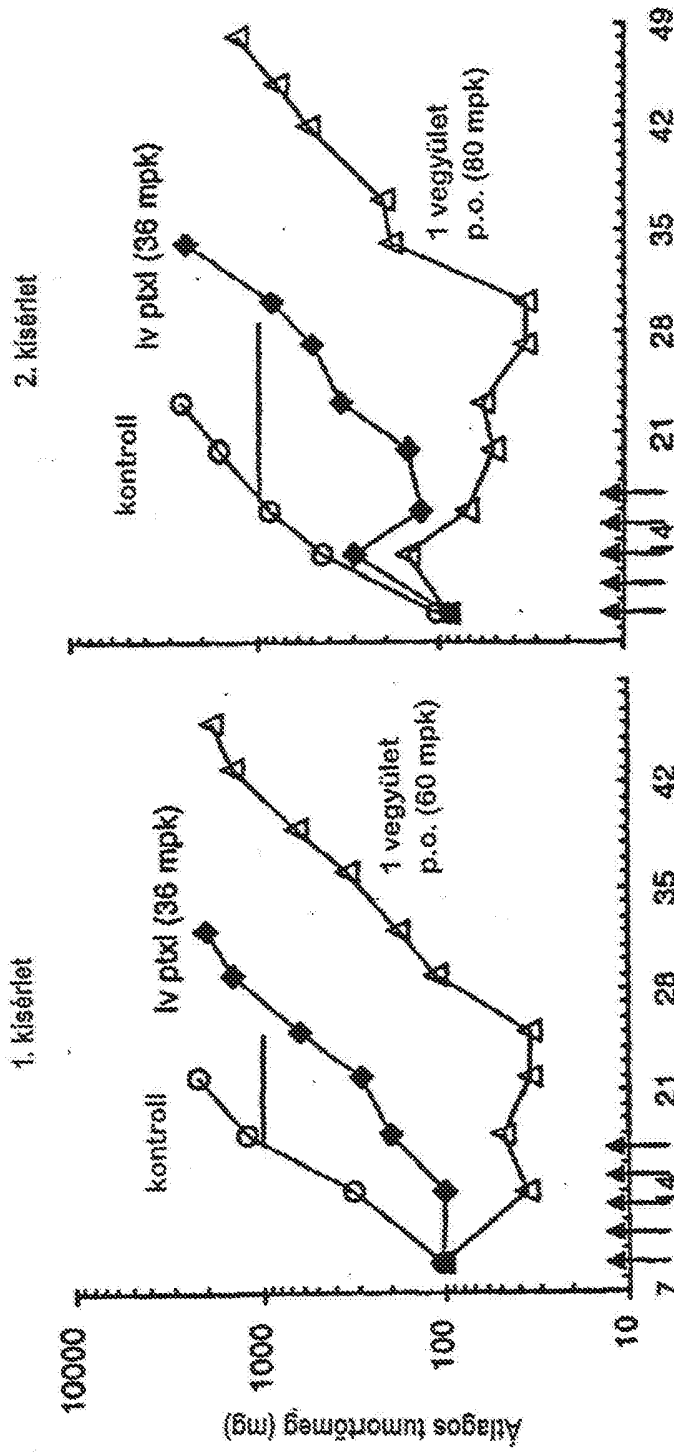


2. ábra

3/5



4. ábra

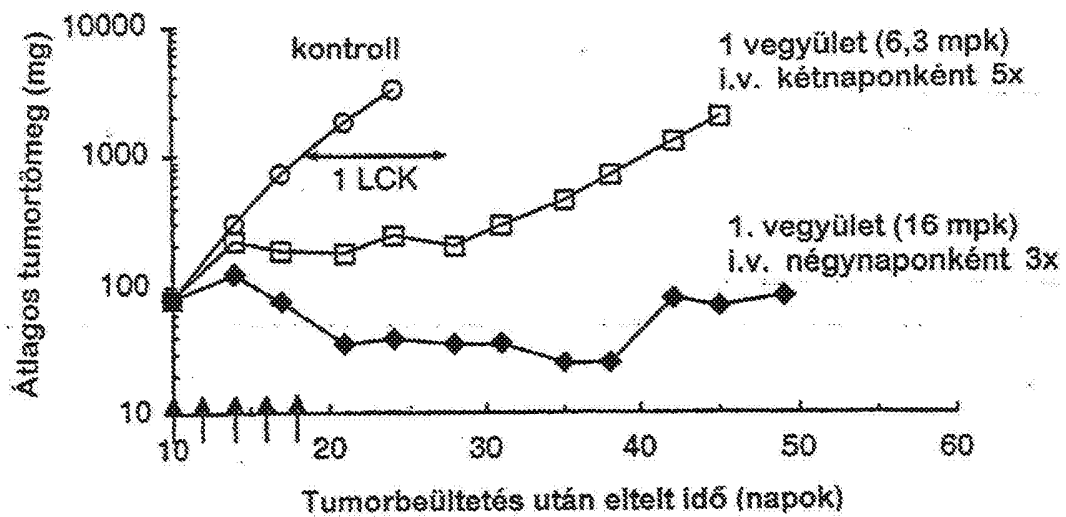


Tumorbeültetés után eltelt idő (napok)

5B. ábra

5A. ábra

5/5



6. ábra