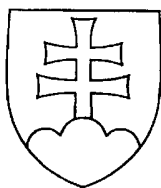


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **6. 11. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/246 233
60/248 095, 60/345 982**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **6. 11. 2000
13. 11. 2000, 19. 10. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: **US, US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 3. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/GB01/04902**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/36135**

(11), (21) Číslo dokumentu:

549-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7 :

**A61K 35/00,
A61K 45/06,
A61K 31/495**

(71) Prihlasovateľ: **PHARMA MAR, S. A., Madrid, ES;**

(72) Pôvodca: **Takahashi Naoto, New York, NY, US;
Weitman Steve, San Antonio, TX, US;
D'Incalci Maurizio, Milan, IT;
Faircloth Glynn Thomas, Cambridge, MA, US;
Giavazzi Rafaella, Milan, IT;
Gescher Andreas, Woodhouse Eaves, GB;**

(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie Ecteinascidínu 743 na výrobu lieku na protinádorovú liečbu**

(57) Anotácia:
Ecteinascidín 743, ET-743, je použitý na prípravu lieku na účinnú liečbu nádorov založenú na kombinovanej terapii využívajúcej ET-743 s ďalšími liečivami.

SK 549-2003 A3

Ecteinascidín
Použitie ET-743 na výrobu lieku na protinádorovú liečbu

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa vzťahuje k účinnej protinádorovej liečbe.

Ecteinascidín 743, ET-743, je látka s protinádorovým účinkom získaná z morského zdroja.

K získaniu informácií o zložení ET-743 a jeho použitia v protinádorovej liečbe odkazujeme na patent č. WO 0069441, publikovaný 23. novembra 2000.

Podstata vynálezu

V rámci jedného aspektu tohto vynálezu poskytujeme účinné kombinované liečebné postupy založené na Ecteinascidíne 743 s využitím ďalších liečiv.

Ďalšie použité liečivá môžu byť súčasťou jedného prípravku alebo sa môžu vyskytovať vo forme jednotlivých prípravkov určených k podaniu naraz alebo v rôznom čase. Okruh týchto ďalších liečiv nie je nijako špecificky obmedzený, medzi vhodné kandidáti je možné zaradiť:

- a) liečivá s antimitotickým účinkom, najmä tie, ktoré sú cielené proti zložkám cytoskeletu, vrátane mikrotubulárnych modulátorov ako sú taxány (napr. taxol, paclitaxel, taxoter, docetaxel), podofylotoxíny alebo vincaalkaloidy (vincristín, vinblastín);
- b) antimetaboly ako je 5-fluórouracil, cytarabín, gemcitabín, analógy purínov (napr. pentostatín, metotrexát);
- c) alkylačné činidlá ako analógy horčíčného dusíka (napr. cyklofosfamid alebo ifosfamid);
- d) liečivá cielené proti DNA ako sú antracyklíny adriamycin, doxorubicin, farmorubicin alebo epirubicin;
- e) liečivá namierené proti topoizomerázam ako etoposid;
- f) hormóny a agonisti alebo antagonisti hormónov ako sú estrogény, antiestrogény (tamoxifén a od neho odvodené zlúčeniny) a androgény, flutamid, leuprorelin, goserelin, cyprotrón alebo octreotid;
- g) liečivá zasahujúce do prenosu signálu v nádorovej bunke vrátane tých, odvodených od protilátok, napr. herceptín;

- h) alkylačné látky ako sú platinové preparáty (cisplatina, karbonplatina, oxaliplatina, paraplátina) alebo deriváty nitrosurey;
- i) liečivá potenciálne ovplyvňujúce metastazovanie nádorov ako sú inhibítory matrixové metaloproteínsy;
- j) génová terapia a tíšiacе prostriedky/alternatívne (antisense) liečivá;
- k) protilátky využívané v protinádorovej terapii;
- l) ďalšie bioaktívne zlúčeniny morského pôvodu, najmä didemniný ako je aplidín;
- m) analógy steroidov, najmä dexametazón;
- n) protizápalové lieky, najmä dexametazón;
- o) antiemetika, najmä dexametazón.

V rámci podrobného opisu tohto patentu uvádzame niekoľko príkladov, na ktoré na tomto mieste odkazujeme. Tieto príklady ukazujú zvýšenú účinnosť ET-743 v prípade jeho použitia v kombinácii s ďalšími liečivami a zaoberajú sa rôznymi kombináciami používajúcimi ET-743.

Príklad 1 opisuje účinné kombinácie ET-743 a doxorubicínu inhibujúce nádorový rast myších a ľudských sarkómov u athymických myší.

Príklad 2 ukazuje synergický cytotoxický účinok ecteinascidínu 743 (ET-743) a doxorubicínu na sarkómy mäkkých tkanív u línii HT-1080 a HS-18.

Tieto dva príklady ukazujú, že u kombinácie ET-743 s antracyklínmi (najmä doxorubicínom) sa jedná o viac než samý aditívny účinok, keď táto kombinácia je proti ľudským nádorom (v týchto príkladoch sarkómom) účinnejšia než izolované použitie uvedených liečiv a ich účinok nezávisí na poradí podania liečiv. Tieto výsledky prejavujú jasnú nádej na liečbu pacientov.

Príklad 3 ukazuje synergický cytotoxický účinok ET-743 s cisplatinou.

Príklad 4 poskytuje vyhodnotenie účinnosti v závislosti na poradí aplikácie u kombinácií ET-743 s chemoterapeutikami proti skupine ľudských nádorových bunčných línii, najmä kombinácií ET-743 s doxorubicínom, taxolom, SN-38, cisplatinou a gemcitabínom.

Tieto dva príklady ukazujú, že účinok kombinácií ET-743 s platinovými protinádorovými preparátmi (najmä s cisplatinou), nukleosidovým analógom gemcitabínom a inhibítorom topoizomerázy II (SN-38, čo je účinná látka vyrábaná z CPT-11, liečivá

kamptotecinovej skupiny) je väčší než len aditívny. Účinok týchto kombinácií proti ľudským nádorom je teda opäť vyšší než účinok pri samostatnom použití liečiv (v týchto konkrétnych príkladoch boli uvedené kombinácie použité proti rôznym nádorovým bunkám: ovariálnym, bunkám hrubého čreva, pľúcny, prsníka, kostného sarkómu), v niektorých príkladoch bol účinok na nádor závislý na poradí expozície nádoru jednotlivým chemoterapeutikám. Tiež v tomto prípade ponúka výsledky nádej na liečbu pacientov.

Bolo zaujímavé, že synergizmus nebolo možné vopred predvídať: príklad 4 ukazuje, že vo väčšine testovaných kombinácií nebol pozorovaný žiadny synergizmus (v niektorých bol dokonca zaznamenaný antagonizmus účinku chemoterapeutík).

Príklad 5 sa vzťahuje k hodnoteniu kombinácie ET-743 s doxorubicínom alebo trimetrexátom alebo paclitaxelom. Ukazuje väčší než len aditívny účinok kombinácie ET-743 s antracyklinmi (najmä doxorubicínom), ktorý je pri použití proti ľudským nádorom (tu je konkrétne proti sarkómom) vyšší než samostatný účinok akéhokoľvek z chemoterapeutík a je nezávislý na poradí aplikácie liečiv. Takéto závery ponúkajú nádej na liečbu pacientov.

Príklady 6 až 8 podporujú a dopĺňajú predchádzajúce príklady a ukazujú najmä synergiju ET-743 s doxorubicínom a ET-743 s cisplatinou.

Príklad 9 predstavuje odlišný typ účinnosti kombinácií opisovaných týmto vynálezom a to použitie vysokých dávok dexametazónu chrániacich pred hepatotoxicitou ecteinascidínu-743 (ET-743).

V zhrnutí, tento vynález ponúka prípravky, spôsoby liečby, postupy výroby uvedených prípravkov a konkrétnu realizáciu prípravkov.

Predkladaný vynález sa vzťahuje tiež na použitie vynálezom opisovaných zlúčenín v liečebnom postupe a na použitie zlúčenín vo výrobe prípravkou na liečbu rakoviny.

Predkladaný vynález teda ponúka spôsob liečby zhubného nádorového ochorenia vyskytujúceho sa u akéhokoľvek cicavca, najmä človeka, kde tento spôsob zahŕňa podanie terapeuticky účinného množstva vynálezom opísanej zlúčeniny alebo viac zlúčenín alebo z nej vytvoreného farmaceutického prípravku postihnutému jedincovi.

Predkladaný vynález sa tiež vzťahuje k farmaceutickým prípravkom zahrňujúcim farmaceuticky akceptovateľný nosič, ktorý ako aktívnu zložku obsahuje vynálezom opísanú zlúčeninu alebo zlúčeniny, a zároveň sa vynález vzťahuje k postupom výroby týchto prípravkov.

Príklady farmaceutických prípravkov zahrnujú akúkoľvek pevnú (tablety, pilulky, kapsule, granule, atď.) alebo kvapalnú (roztoky, suspenzie alebo emulzie) formu so zodpovedajúcim zložením umožňujúcim perorálnu, lokálnu alebo parenterálnu aplikáciu, keď tento prípravok môže obsahovať čistú zlúčeninu alebo prímes akéhokoľvek nosiča alebo iných farmaceuticky aktívnych zlúčenín. Na parenterálnu aplikáciu je nutné, aby tieto prípravky boli sterilné.

Zlúčeniny alebo prípravky opisované predkladaným vynálezom je možné aplikovať akýmkoľvek vhodným spôsobom ako je intravenózna infúzia, perorálne, intraperitoneálne alebo intravenózne podanie. My uprednostňujeme infúzne podanie s dĺžkou trvania infúzie do 24 hodín, lepšie však v rozmedzí 2 až 12 hodín, optimálne v rozmedzí 2 až 6 hodín. Najvýhodnejšie sú krátkodobé infúzie umožňujúce liečbu bez nutnosti hospitalizácie pacienta cez noc. Pokiaľ to však situácia vyžaduje môže dĺžka infúznej terapie dosahovať 12 až 24 hodín alebo byť aj dlhšia. Infúzie môžu byť aplikované vo vhodných intervaloch asi 2 až 4 týždne. Farmaceutické prípravky obsahujúce zlúčeniny opisované predkladaným vynálezom môžu byť do miesta účinku dopravované v lipozómoch alebo pomocou nanosferickej enkapsulácie, môžu byť v podobe dlhodobu sa uvoľňujúcich prípravkov alebo dopravované do organizmu formou iných štandardných prostriedkov.

Správna dávka zlúčenín sa bude líšiť v závislosti na konkrétnom zložení prípravku, jeho spôsobu podania a konkrétneho stavu liečeného pacienta a štádia nádorového ochorenia. Je nutné zvážiť ďalšie faktory ako je vek chorého, váha, pohlavie, doba podania, rýchlosť exkrécie, kombinácie použitých liečiv, citlivosť odpovede a závažnosť ochorenia. Podávanie môže byť kontinuálne alebo opakované, splňujúce limit maximálne tolerovanej dávky (MTD).

Kombinácie opisované týmto vynálezom môžu byť použité u refrakterných pacientov (nedpovedajúcich na iný spôsob liečby). Na informácie o dávkovacích schémach ET-743 a ďalšom použití v kombinovanej terapii opisované týmto vynálezom, odkazujeme čitateľov na patent č. WO 006 944 1.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Účinné kombinácie ET-743 a doxorubicínu inhibujúce nádorový rast u myší a ľudských sarkómov atymických myší

Potvrdili sme klinickú aktivitu ET-743 u pacientov so sarkómom mäkkých tkanív alebo kostí neodpovedajúcich na doterajšiu chemoterapiu vrátane doxorubicínu (DXR) a izosfamidu.

Vzhľadom k potenciálnemu klinickému významu kombinovania ET-743 s Dx sme testovali túto kombináciu u myšieho fibrosarkómu UV2237, u jeho mdr-rezistentného subtypu UV2237/ADR a u xenograftu ľudského rabdomyosarkómu TE671. ET-743 aj Dx boli každý izolovane účinný u bunečnej línie myšieho fibrosarkómu UV2237, zatiaľ čo ani jeden nebol alebo bol len obmedzene účinný proti líniam UV2237/ADR a TE671. Naproti tomu, kombinácia ET-743 s Dx bola účinná v prípade všetkých troch modelov. Synergizmus bol obzvlášť významný proti ľudskému rabdomyosarkómu TE671 a zdalo sa, že nie je závislý na poradí aplikácie liečiv alebo na kombinácii.

Po jednorázovom i.v. zaliečení uskutočnenom vo fáze, keď masa tumor TE671 dosahovala približne 100 mg, došlo k hmotnostnej regresii tumoru (TWI) a logaritmickejmu poklesu počtu buniek (\log_{10} cell kill – LCK), respektíve, o 46% a 0,132 po samotnej aplikácii ET-743 (0,1 mg/kg), o 50% a 0,33 po samostatnej aplikácii Dx (10 mg/kg), o 77% a 0,924 po súčasnej aplikácii ET-743 (0,1 mg/kg) a Dx (10 mg/kg), o 82% a 1,12 po kombinovanej aplikácii ET-743 (0,1 mg/kg) 1 hodinu pred Dx (10 mg/kg) a o 75% a 0,85 po kombinovanej aplikácii ET-743 (0,1 mg/kg) 1 hodinu po Dx (10 mg/kg).

Tieto dáta naznačujú, že kombinácia ET-743 a Dx môže byť účinná u tumorov, ktoré sú len minimálne alebo vôbec citlivé na samostatné podanie týchto liečiv a poskytujú tak silný dôvod na vykonanie klinických skúšok na použitie tejto kombinácie.

Príklad 2: Ecteinascidín 743 (ET-743) a Doxorubicín pôsobia synergický cytotoxický účinok u bunečných línii sarkómov mäkkých tkanív HT-1080 a HS-18.

U dvoch bunečných línii sarkómov, HT-1080, fibrosarkómovej línie citlivej na ET-743 ($IC_{50} = 10$ pm) a HS-18, liposarkómovej línie s nižšou citlivosťou k ET-743 ($IC_{50} = 270$ pm) bol hodnotený toxický vplyv ET-743 v kombinácii s jedným z nasledujúcich liečiv – doxorubicínom, trimetrexátom alebo paclitaxelom. Pri použití ET-743 v kombinácii s každým z týchto liečiv pri konštantnom molárnom pomere a následnej analýze pomocou metódy Chou a Talalay bolo dosiahnuté (po 72-hodinovej inkubácii) synergického účinku u

kombinácie ET-743-doxorubicín, tento účinok sa však neobjavil u kombinácie ET-743 s trimetrexátom alebo paclitaxelom. Pri 72-hodinovej expozícii buniek ET-743 a následnej 48-hodinovej expozícii doxorubicínu, trimetrexátu alebo taxolu bol synergický účinok proti oboom sarkomovým bunečným líniam tiež získaný u kombinácie s doxorubicínom. Zaujímavé bolo zistenie, že aplikácia, keď prvý bol podaný paclitaxel a až následne ET-743 mala vyššiu účinnosť, než aplikácia vykonaná v opačnom poradí. Tieto výsledky podporujú klinické štúdie na liečbu pacientov so sarkómom mäkkých tkanív pomocou kombinácie doxorubicínu s ET-743 na základe zistenej aktivity oboch týchto liečiv proti tomuto typu ochorenia.

Príklad 3: Synergický cytotoxický účinok ET-743 a cisplatiny

U Ecteinascidínu 743 (ET-743) bola preukázaná výrazná protinádorová aktivita na niekoľkých predklinických systémoch a vytvorila tak nádeje aj na klinickú aktivitu. ET-743 viaže N2 guaníny v malom žliabku dvojskrutkovice DNA a ovplyvňuje reguláciu transkripcie (Minuzzo et al., PNAS, Vol. 97, 6780-84, 2000).

Predchádzajúce štúdie ukázali, že bunky s poruchou reparačného aparátu (MMR) vykazujú rovnakú citlivosť k ET-743 ako bunky s normálnou funkciou MMR. NER-deficientné bunky s vysokou citlivosťou k cisplatine (DDP) sú 6- až 8-krát menej citlivé k ET-743. Na základe odlišnosti mechanizmov zaisťujúcich (nádorovej bunke) opravu defektov spôsobených ET-743 a cisplatinou a vzhľadom k potenciálnemu klinickému záujmu o túto kombináciu, vykonali sme štúdiu hodnotiacu cytotoxické účinky ET-743 a cisplatiny na niekoľkých ľudských nádorových líniami. V tejto štúdii bola použitá bunečná línia karcinómu ovaria Igrove-1, jej subtyp rezistentný k ET-743 (IG/PSC/ET) a bunečnej línie karcinómu hrubého čreva HCT 116 (MMR-deficientný) a HCT11-ch3 (s normálnou funkciou MMR).

Bunky boli exponované po dobu 1 alebo 24 hodín rôznymi koncentraciám samostatne aplikovaného ET-743 alebo DDP alebo ich kombináciami a cytotoxický účinok bol po odfarbení sulforothamínom B hodnotený pomocou kalorimetrickej kvantifikácie. U všetkých bunečných línii bol v oboch prípadoch jednodinovej aj 24-hodinovej inkubácie pozorovaný synergický účinok. Zaujímavé bolo zistenie, že u HCT116 rezistentného k DDP zrejme ET-743 umožnilo spätné dosiahnutie senzitivity a to aj v koncentraciách, pri ktorých

má pri samostatnej aplikácii minimálny účinok. Zhrnutie získaných dát poskytuje dôvod k pristúpeniu ku klinickým skúškam na kombináciu ET-743 s DDP.

Príklad 4: ET-743 v kombinácii s doxorubicínom, taxolom, SN-38, cisplatinou a gemcitabínom

Hodnotili sme účinok ET-743 v kombinácii s doxorubicínom, taxolom, SN-38, cisplatinou a gemcitabínom proti panelu ľudských nádorových bunecných línií. Tieto štúdie boli navrhnuté s cieľom určiť typ vzájomnej interakcie liečiv a to medzi ET-743 a štandardnými chemoterapeutikami a vplyv poradia podania jednotlivých liečiv na protinádorový účinok. K opisu typu vzájomnej interakcie liečiv bolo použitých mnoho kombinácií ET-743 so štandardnými cytotoxickými činidlami bez použitia modelového systému (Laska et al., Biometrics 50:834, 1994) Tieto štúdie ukazujú, že bez ohľadu na expozíciu sa najčastejšie pozoruje aditívny typ vzájomnej interakcie liečivo-liečivo.

Synergický účinok pri vzájomnej interakcii liečiv bol pozorovaný v prípadoch, keď kombinácia s ET-743 bola použitá proti bunecným líniám nemalobunecnému karcinómu pľúc (predchádzala expozícia SN-38), osteosarkómu (preexpozícia s ET-743, následne cisplatina), karcinómu prsníka (preexpozícia s ET-743, následne gemcitabín), karcinómu hrubého čreva (preexpozícia s ET-743, následne SN-38 a súčasná expozícia ET-743 a SN-38). Bol zaznamenaný prechodný aditívny/synergický účinok pri vzájomnej interakcii (preexpozícia s ET-743, následne SN-38 u bunecnej línie nemalobunecného karcinómu pľúc (NSCL); preexpozícia s SN-38 u karcinómu čreva a NSCL; súčasná expozícia ET-743 a cisplatine u osteosarkómu a ET-743 a SN-38 u NSCL). Antagonizmus bol preukázaný pri súčasnom použití ET-743 s taxolom u dvoch NSCL línií a s doxorubicínom u rabdomyosarkomovej línie.

Tieto štúdie ukazujú, že ET-743, ktorý je v druhej fáze klinických skúšok, by sa mohol v kombinácii s niekoľkými cytotoxickými látkami používať proti širokému spektru nádorov.

Materiál a Metódy

Bunecná kultúra:

Nádorové bunecné línie ľudskeho karcinómu prsníka (MDA-435, MDA-231, T-470), nemalobunecného karcinómu pľúc (NCI-H522, NCI-H226, NCI-H23), karcinómu hrubého čreva (HCT-116, HT-29, Colo-320), osteosarkómu (HOS, U-2, OS, SaOS-2), rabdomyosarkómu (RH1, RH30, RD) boli vykultivované v RPMI-1640 obohatenom o 10% fetálne bovinné sérum a 2 mM L-glutamín. Všetky kultivované kultúry boli udržiavané v kultivačných fľašiach (75 cm²) pri teplote 37 °C vo zvlhčovacích inkubátoroch v atmosfére s 5% podielom CO₂ a 95% vzduchu.

Analýza IC₅₀:

Vopred definované množstvo exponenciálne sa množiacich nádorových buniek bolo inokulované do 96-tich jamkových doštičiek pre tkanivové kultúry a fixované po dobu 24 hodín. Následne bola ku tkanivovým kultúram pridaná doštička s liečivami tvorená postupným koncentračným riedením ET-743 alebo štandardných chemoterapeutík. Inkubácia buniek bola vykonaná formou 24-hodinových expozícií po dobu 3 dní s následným pridaním MTT na dobu 4 hodín. Kryštály, ktoré vznikli, boli potom rozpustené kyselinou/alkoholom, absorbancia (570 nm – vzorka/630 nm – kontrola) bola určená pomocou odčítavacieho systému pre mikrotitračnú dosku. Výsledky boli vyjadrené ako percentá úmrtia nádorových buniek vzťahnutá k priemernej hodnote kontrol.

Kombinačné štúdie:

Koncentračná schéma (koncentrácia vyjadrená ako percentá z IC₅₀ jednotlivých liečiv) použitá na charakterizáciu typu vzájomnej interakcie liečiv v kombinačných štúdiách je ukázaná nižšie:

| Koncentrácia liečiva (vyjadrená v percentách IC ₅₀) | |
|---|--------------------|
| ET-743 | Štandardné liečivo |
| 100 | 0 |
| 75 | 25 |
| 60 | 40 |
| 50 | 50 |
| 40 | 60 |

| | |
|----|-----|
| 25 | 75 |
| 0 | 100 |
| 0 | 0 |

Štatistická analýza kombinačných štúdií:

Štatistické porovnania sú vykonané s každou testovacou kombináciou (75:25 – ET-743/štandardné účinné látky) a krajnými hodnotami (100:0 – ET-743 a 0:100 – štandardné účinné látky). Štatisticky významné pozorovanie vyžaduje existenciu rozdielu medzi hodnotou absorpcie kombinácie (medzi ET-743 a štandardnými účinnými látkami) a oboma krajnými hodnotami (ET-743 a štandardné účinné látky izolovane). Pokiaľ väčšina hodnôt (3 z 5) je štatisticky nad alebo pod definovanou hranicou, potom opisujeme antagonizmus, respektíve synergizmus. Iné rozloženie nameraných hodnôt zodpovedá skôr aditívnemu účinku pri vzájomnej interakcii. Veľmi obtiažna je interpretácia v prípade významného priblíženia ku spojnici krajných hodnôt. Pokiaľ sklon kriviek pre IC₅₀ jednotlivých látok je rovnaký (nepravdepodobné), potom je v danom prípade možné určiť typ interakcie.

| Postupné kombinácie ET-743 s chemoterapeutikami | | |
|---|--|-----------------------------|
| Typ tumoru/bunečná línia | Podmienky expozície/liečivo | Zistená vzájomná interakcia |
| Osteosarkóm | | |
| NOS | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín cisplatina; | Synergia |
| | 24 hodín cisplatina, následne 24 hodín ET-743; | Aditívny účinok |
| | 24 hodín súčasne ET-743 a cisplatina | Aditívny účinok |
| U2-OS | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín cisplatina; | Aditívny účinok |
| | 24 hodín cisplatina, následne 24 hodín ET-743; | Aditívny účinok |
| | 24 hodín súčasne ET-743 a cisplatina | Aditívny účinok |

| | | |
|-----------------------------|--|---|
| | cisplatina | |
| Sa06 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín cisplatina; 24 hodín cisplatina, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a cisplatina | Aditívny účinok Aditívny účinok Aditívny účinok |
| Nemalobunečný karcinóm pľúc | | |
| NCB-H226 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín taxol; 24 hodín taxol, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a taxol; 24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38; 24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a SN38 | Aditívny účinok Aditívny účinok Antagonizmus Aditívny účinok/Synergizmus Aditívny účinok/Synergizmus Aditívny účinok |
| NCB-N522 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín taxol; 24 hodín taxol, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a taxol; 24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38; 24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743; | Aditívny účinok Aditívny účinok Antagonizmus Aditívny účinok/Synergizmus Aditívny účinok/Synergizmus |

| | | |
|------------------|--|--|
| | 24 hodín súčasne ET-743 a SN38 | Aditívny účinok |
| NCB-N23 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín taxol; 24 hodín taxol, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a taxol; 24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38; 24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a SN38 | Aditívny účinok/Antagonizmus Aditívny účinok Antagonizmus Aditívny účinok Synergizmus Aditívny účinok/Synergizmus |
| Karcinóm prsníka | | |
| MDA-435 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín gemcitabín; 24 hodín gemcitabín, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a gemcitabín | Aditívny účinok Aditívny účinok Aditívny účinok |
| MDA-231 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín gemcitabín; 24 hodín gemcitabín, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a gemcitabín | Aditívny účinok Aditívny účinok Aditívny účinok |
| T47-8 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín gemcitabín; 24 hodín gemcitabín, následne 24 hodín ET-743; | Aditívny účinok Aditívny účinok |

| | | |
|------------------------|--|---|
| | 24 hodín súčasne ET-743 a gemcitabín | Aditívny účinok |
| Karcinóm hrubého čreva | | |
| MCT-116 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38; 24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a SN38 | Synergizmus Aditívny účinok Aditívny účinok |
| NT-29 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38; 24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a SN38 | Aditívny účinok Aditívny účinok Aditívny účinok |
| Colo-320 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38; 24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a SN38 | Aditívny účinok Aditívny účinok/Synergizmus Synergizmus |
| Rabdomyosarkóm | | |
| RN1 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín doxorubicín; 24 hodín doxorubicín, následne 24 hodín ET-743 24 hodín súčasne ET-743 a doxorubicín | Aditívny účinok Aditívny účinok Aditívny účinok |
| RD | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín doxorubicín; 24 hodín doxorubicín, | Aditívny účinok Aditívny účinok |

| | | |
|------|--|--|
| | následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a doxorubicín | Aditívny účinnok/Antagonizmus |
| RN30 | 24 hodín ET-743, následne 24 hodín doxorubicín; 24 hodín doxorubicín, následne 24 hodín ET-743; 24 hodín súčasne ET-743 a doxorubicín | Aditívny účinnok Aditívny účinnok Antagonizmus |

Závery

Tieto štúdie naznačujú, že bez ohľadu na poradí expozície medzi ET-743 a štandardnými chemoterapeutikami, najobvyklejším pozorovaným typom interakcie liečivo-liečivo je aditívny účinnok.

Preukázateľný synergický účinnok bol pozorovaný u preexpozície SN-38 u NSCL bunčných líniiach NC1-H522 a NC1-H23, preexpozície ET-743 pri jeho kombinácii s cisplatinou u HOS osteosarkómu, s gemcitabínom u línii karcinómu prsníka T-470, preexpozície SN-38 u karcinómu hrubého čreva HCT-116 a súčasná expozícia ET-743 a SN-38 u línii karcinómu hrubého čreva Colo-320. Antagonizmus bol preukázaný pri súčasnom použití ET-743 s taxolom u NSCL línii NC1-H522 a NC1-H23 a s doxorubicínom u RHI rabdomyosarkómovej línii.

Príklad 5: Interakcie medzi ET-743 a inými látkami používanými k liečbe nádorov

Aj keď je ET-743 v súčasnej dobe v štádií klinických štúdií na liečbu nádorov u ľudí, mechanizmus jeho protinádorového účinku nebol doposiaľ plne objasnený. Cieľom tejto štúdie bolo stanoviť podstatu interakcie medzi ET-743 a inými protinádorovými účinnými látkami (doxorubicín; DXR, trimetrexát; TMTX a paclitaxel; taxol) pomocou metódy kombinačného indexu (CI) Chou a Talalay. Na lepšie pochopenie možností klinického využitia ET-743 použila predkladaná štúdia SRB kvantitatívnu metódu pre *in vitro* testovanie cytotoxicity dosiahnutej kombináciou ET-743 s tromi ďalšími protinádorovými látkami pri použití v rôznych dávkovacích schémach u dvoch líniiach sarkómov mäkkých

tkanív, HT-1080 a HS-18. DXR jediný v kombinácii s ET-743 dosahoval synergie nezávislej na poradí aplikácie. Súčasná aplikácia ET-743 s DXR viedla k synergickému účinku u oboch bunečných línií.

CI (priemerné) na dané dávkovacie schéma 0,86, 0,83, 0,84 a 0,85 pri 50%, 75%, 90% a 95% zániku buniek, respektíve, u HT-1080 línie a 0,89, 0,74, 0,64 a 0,60 pri 50%, 75%, 90% a 95% zániku buniek, respektíve u HS-18 línie. Poradie, keď 24 hodinová inkubácia s ET-743 predchádzala aplikácii doxorubicínu, sa ukázalo ako najúčinnější postup u oboch bunečných línií; výsledkom bol sústavne nízky CI odpovedajúci až 90% hodnote zániku nádorových buniek u oboch línií. Účinný bol aj postup, keď expozícia taxolu predchádzala ET-743. Tieto výsledky naznačujú vhodnosť ďalšieho testovania kombinácie ET-743 s doxorubicínom v klinických štúdiách zameraných na liečbu sarkómu mäkkých tkanív.

Materiál a Metódy

Chemikálie

Použitá ET-743 poskytla Pharma-Mar S.A. (Tres Cantos, Madrid, Spain) a bolo pripravené/dodané vo forme 2 mM roztoku v dimetylsulfoxide. Paclitaxel a DXR bol získaný od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) a TMTX poskytla Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich., USA).

Bunečná kultúra

Bunečné línie sarkómu mäkkých tkanív, HT-1080 a HS-18, sa nechali narásť v jednej vrstve v RP<I-1640 obsahujúcej 10% fetálneho bovinneho séra.

SRB kvantifikácia cytotoxicity

Cytotoxicita aktívnych látok bola určená pomocou SRB kvantifikácie cytotoxicity vykonanej v 96-jamkových mikrotitračných doštičkách podľa popísaného postupu. Bunky boli umiestnené do jamiek v duplikáte (5000 buniek/jamka) a vystavené účinku liečiv o rôznych koncentráciách. Bunky boli fixované 50% roztokom TCA po dobu 1 hodiny a do každej jamky bolo pridané 0,4% SRB (sigma). Po 30-minutovej inkubácii boli doštičky premyté 1% kyselinou octovou a odčítané pri 570 nm na odčítavacom zariadení pre mikrotitračné doštičky Biowhitaker microplate reader 2001. Jamky, ktoré obsahovali bunky,

ale boli bez liečiva a jamky s médiom a liečivami, ale bez obsahu buniek, boli použité ako pozitívna a negatívna kontrola, respektíve.

Súčasná expozícia ET-743 a DXR, TMTX alebo paclitaxelu

Bunky boli umiestnené do 96-jamkových doštičiek, ako je opísané vyššie. Kultúry boli ošetrované siedmimi rôznymi koncentráciami jedného liečiva alebo kombináciou liečiv s molárnym pomerom 1:100 (ET-743 : iné liečivo). Po 72 hodinovej expozícii bola rastová inhibícia meraná pomocou SRB kvantifikačnej metódy.

Postupná expozícia ET-743 a DXR, TMTX alebo paclitaxelu

Za použitia rovnakého experimentálneho systému opísaného vyššie, sme nechali na bunky pôsobiť tri rôzne koncentrácie predstavujúce IC25, IC50, IC75 pre ET-743, DXR, TMTX a paclitaxel, respektíve. Po 24 hodinách preexpozície ET-743 alebo kombinácie liečiv bol na dobu 48 hodín pridaný druhý typ liečiva do príslušnej jamky.

Analýza zastúpených fáz bunečného cyklu

Exponenciálne rastúce bunky boli ošetrované v alebo bez prítomnosti liečiva po dobu niekoľkých hodín. Bunky boli potom zobrať a fixované pomocou ľadového 70% metanolu. DNA bola odfarbená propidiumjodidom, ako je opísané vyššie. Desaťtisíc odfarbených buniek bolo analyzované na Becton Dickinson fluorescenčne aktivovanom bunečnom porteri (FACS).

Určenie synergizmu a antagonizmu a konštrukcie izobologramu

CI bol vypočítaný pomocou Chou-Talalayovej rovnice, ktorá započítava ako potenciú (D_m alebo IC_{50}), tak aj tvar krivky závislosti účinku na dávke (hodnota m). Všeobecná rovnica pre klasický izobologram ($CI = 1$) je daná vzťahom:

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

kde $(Dx)_1 + (Dx)_2$ v menovateľoch sú dávky (alebo koncentrácie) pre samotné D_1 (ET-743) a D_2 (iné liečivo) vytvárajúce $X\%$ inhibíciu, zatiaľ čo $(D)_1 + (D)_2$ v číateľoch sú dávky ET-743 a iného liečiva v kombinácii, tiež s hodnotou inhibície $X\%$ (t.j. sú izoeftívne). $CI < 1$, $CI = 1$, $CI > 1$ označujú synergizmus, aditívny účinok a antagonizmus, v uvedenom poradí.

$(Dx)_1 + (Dx)_2$ môžu byť ľahko spočítané podľa rovnice pre stredný účinok podľa Chou a Chou et al.:

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

Kde Dm je dávka odpovedajúca strednému účinku získaná z anti-log X-vymedzení oblasti stredného účinku, X-log (D) verzus Y - log[fa / (1 - fa)] alebo

$Dm = 10^{-(Y\text{-vymedzenie})/m}$, kde m je sklon oblasti stredného účinku. Software Chou a Chou umožňuje automatický výpočet hodnôt m , Dm , Dx a CI. Z $(Dm)_1$, $(Dx)_2$ a $D1 + D2$ je ľahké automaticky podľa rovnice (A) zostaviť izobologram.

Pre konzervatívne vzájomné nevýnimočné izobologramy dvoch aktívnych látok, je k rovnici (A) pridaný tretí výraz:

$$(D1) (D2) / (Dx)_1 + (Dx)_2.$$

Tento tretí výraz sa obvykle pre zjednodušenie vypúšťa a je potom indikované vzájomné výnimočné prevzatie alebo klasický izobologram. V častiach Výsledok 2 a 3, sú udané hodnoty CI získané z klasického (vzájomne exkluzívneho) výpočtu.

Výsledok 1

| Cytotoxický účinok 4 liečiv na HT-1080 a HS-18 | | | |
|--|------|---|--------|
| | | IC ₅₀ pre ľudský sarkóm mäkkých tkanív | |
| | | HT-1080 | HS-18 |
| ET-743 | (nM) | 0,01 | 0,27 |
| DXR | (nM) | 25 | 225 |
| TMTX | (nM) | 6 | 70 000 |
| Paclitaxel | (nM) | 1,3 | 10 |

Táto tabuľka ukazuje, že obe bunčné línie HT-1080 aj HS-18 vykazovali väčšiu citlivosť k ET-743 než k ostatným protinádorovým chemoterapeutikám.

| Účinok každého z chemoterapeutík na distribúciu fáz bunčného cyklu u bunčnej kultúry HS-18 za 24 a 72 hodín po ošetrení dávkou približne IC ₅₀ | | | | | |
|---|-------|----|-----------|----------|-------------|
| Liečivo | Dávka | HR | % G1 fázy | % S fázy | % G2-M fázy |
| | | | | | |

| | | | | | |
|------------|--------|----|------|------|------|
| Kontrola | | | 76,3 | 11,2 | 12,5 |
| ET-743 | 270 pM | 24 | 32,4 | 47,6 | 20,0 |
| | | 72 | 86,7 | 8,4 | 4,9 |
| DXR | 225 nM | 24 | 10,1 | 64,9 | 25,0 |
| | | 72 | 1,3 | 63,8 | 34,9 |
| TMTX | 70 μM | 24 | 44,2 | 53,8 | 1,9 |
| | | 72 | 35,5 | 57,6 | 7,0 |
| Paclitaxel | 10 nM | 24 | 32,8 | 52,5 | 15,5 |
| | | 72 | 23,5 | 58,7 | 26,2 |

| Účinnok každého z chemoterapeutík na distribúciu fáz bunecného cyklu u bunecnej kultúry HT-1080 za 24 a 72 hodín po ošetrení dávkou približne IC ₅₀ | | | | | |
|--|--------|----|-----------|----------|-------------|
| Liečivo | Dávka | HR | % G1 fázy | % S fázy | % G2-M fázy |
| Kontrola | | | 45,5 | 35,8 | 16,7 |
| ET-743 | 10 pM | 24 | 42,6 | 36,1 | 21,3 |
| | | 72 | 81,3 | 10,2 | 6,7 |
| DXR | 25 nM | 24 | 36,1 | 17,5 | 46,4 |
| | | 72 | 46,2 | 5,3 | 48,5 |
| TMTX | 6 nM | 24 | 31,9 | 56,8 | 11,3 |
| | | 72 | 32,0 | 53,7 | 14,4 |
| Paclitaxel | 1,3 nM | 24 | 45,4 | 37,3 | 17,3 |
| | | 72 | 86,0 | 9,0 | 5,0 |

Výsledok 2 ukazuje CI per bunecné línie HT-1080 a HS-18, ktoré boli vystavené súčasnému pôsobeniu ET-743 a jedného z protinádorových liečiv ako je DXR, TMX alebo paclitaxel, s molárnym pomerom kombinovanej zmesi 1:100. Pri ošetrení buniek kombinácií ET-743 s DXR boli všetky hodnoty CI pod 1, čo ukazuje na synergický účinok kombinácie u oboch bunecných línií. CI (priemerné) s týmto dávkovacím schématom boli 0,86, 0,83, 0,84 a 0,85 pri 50%, 75%, 90% a 95% zániku buniek, respektíve, u HT-1080 línie a 0,89, 0,74, 0,64 a 0,60 pri 50%, 75%, 90% a 95% zániku buniek, respektíve, u HS-18 línie. Tento výsledok ukázal, že súčasná expozícia ET-743 a DXR vytvára synergický cytotoxický

účinnok. Naopak, v prípade súčasnej expozície buniek kombinácií ET-743 s TMTX alebo s paclitaxelom bol pozorovaný antagonistický cytotoxický účinok.

CI hodnota bola získaná u oboch bunečných línií, ktoré boli počiatočne ošetrované ET-743 po dobu 24 hodín, s následnou expozíciou DXR po dobu 48 hodín. U oboch bunečných línií počiatočná expozícia ET-743 nasledovaná expozíciou DXR vykázala synergický účinok, hodnota CI pre HT-1080 pri 80% zániku buniek bola $0,64 \pm 0,12$ a pre HS-18 pri 88% zániku buniek bola $0,24 \pm 0,06$. Naopak, expozícia DXR nasledovaná expozíciou ET-743 (Výsledok 3a, spodný obrázok) vykazovala síce na počiatku dobrú hodnotu CI, ale CI pre HT-1080 pri 80% zániku buniek bolo $1,00 \pm 0,03$, čo ukazuje, že účinok tejto kombinácie bol aditívny a CI pri vyššom podiele zaniknutých buniek bol v porovnaní so strednou hodnotou zániku buniek horší u oboch línií.

Pri expozícii buniek ET-743 nasledovanej expozíciou TMTX boli hodnoty CI pre HT-1080 blízke alebo presahujúce 1, čo ukazuje, že účinok týchto dvoch látok je antagonický alebo aditívny. Naopak, hodnoty pre HS-18 nepresahovali 0,6 čo ukazuje na synergický účinok oboch látok. Pri ošetrovaní buniek kombináciou v poradí TMTX nasledovaným ET-743 bol u oboch bunečných línií, HT-1080 a HS-18, zaznamenaný aditívny účinok.

Expozícia paclitaxelu nasledovaná expozíciou ET-743 viedla k synergickému cytotoxickému účinku. Pri expozícii v tomto poradí bola hodnota CI pre HT-1080 pri 89% zániku buniek $0,92 \pm 0,06$ a pre HS-18 pri 78% zániku buniek $0,38 \pm 0,13$.

Zhrnutie

ET-743 je vysoko účinné proti bunkám sarkómov mäkkých tkanív, najmä proti malignej fibrosarkómovej línii HT-1080.

DXR v kombinácii s ET-743 vytvára synergický účinok nezávislý na poradí expozície, ale expozícia ET-743 nasledovaná DXR sa javí ako účinnejšia u oboch bunečných línií.

Expozícia paclitaxelu nasledovaná expozíciou ET-743 sa tiež ukázala ako účinná proti bunkám ľudským sarkómov mäkkých tkanív, avšak súčasná aplikácia mala antagonický účinok.

Príklad 6: Kombinácia chemoterapeutík s ecteinascidínom 743 (ET-743) použité *in vivo* u solidných nádorov

Bolo opísané niekoľko špecifických mechanizmov účinku ET-743 zahrnujúcich väzbu v malom žliabku DNA, alkyláciu N2 guanínov, transkripčnú inhibíciu MDR1 génu (Jin et al., PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo et al., PNAS 97, 6780, 2000) a vplyv na zníženie aktivácie jaderného receptora SXR (Synold et al., Nature Med 7, 584, 2001). Samostatne, ET-743 inhibuje *in vivo* nádorový rast s dosiahnutím kompletnej remisie u niekoľkých ľudských nádorových línií/kmeňov (Hendriks et al., Ann Oncol 10, 1233, 1999) zahrnujúcich melanóm (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), karcinóm ovaria (HOC 22) a prsníka (MX-1). Účinnosť ET-743 v kombinácii s liečivami pôsobiacimi iným mechanizmom môže pomôcť znížiť toxicitu jednotlivých použitých liečiv alebo zvýšiť účinnosť liečiva u rezistentných nádorov alebo relapsov.

Na zhodnotenie významu účinku týchto kombinácií bolo niekoľko účinných látok zahrnujúcich doxorubicín (DXR; 8 mg/kg), cisplatinu (DDP; 12 mg/kg) a vinblastin (VINB; 6 mg/kg) podaných pred/po ET-743 (0,2 mg/kg), keď predchádzalo ošetrovanie buniek gdx5 1 hodinu pred expozíciou, u týchto nádorov; chondrosarkóm (CSHA), osteosarkóm (OSA-FH), fibrosarkóm (SW 684), tumor ovaria (MRI-H-1834), NSCL (LX-1) a tumor ľadviny (MRI-H-121) s účinkom definovaným ako < 50 % T/C. U dutovláknového modelu (hollow fiber - HF) vychádzala kombinácia DXR 1 hodinu pred ET-743 konštantne účinnejšia než samotné podanie ET-743 v prípade chondrosarkómu (6% vs. 10%), fibrosarkómu (33% vs. 48%) a osteosarkómu (20% vs. 34%). Osteosarkómové xenografy vykazovali podobné výsledky s 17% vs. 43%. HF štúdie s DDP ukázali vyššiu účinnosť u ET-743 podaného pred DDP v porovnaní so samotným podaním ET-743 v prípade ovariálneho nádoru (28% vs. 100%) a osteosarkómu (15% vs. 19%) a rovnakú účinnosť u osteosarkómu (39% T/C). Dáta získané u xenografu potvrdzujú, že podanie ET-743 pred DDP je účinnejšie než samotné podanie ET-743 (35% vs. 66%). Výnimkou bol prípad NSCL, kde samostatné podanie ET-743 nebolo účinné (62% T/C), ale podanie DDP nasledované ET-743 viedlo k CR (< 1% T/C). U ľadvinových xenografov bolo samostatné podanie ET-743 veľmi účinné (22% T/C), ale aj podanie ET-743 nasledované VINB viedlo k CR (< 1% T/C). Prebiehajú samostatné štúdie s ďalšími štandardnými liečivami u xenografov nádorov prsníka, ľadviny, žalúdka a melanómu.

Príklad 7: Predklinická aktivita a biodistribúcia kombinácií ecteinascidínu 743 (ET-743) s doxorubicínom (DXR) u ľudského rhabdomyosarkómu

ET-743 je prvý z novej triedy protinádorových látok s preukázanou protinádorovou aktivitou. Bola preukázaná účinnosť ET-743 u pacientov so sarkómom refrakterným k DXR a ifosfamidu. Vzhľadom k potenciálu ET-743 ako účinného liečiva, sme skúmali (1) predklinickú protinádorovú aktivitu kombinácie ET-743/DXR u ľudského rhabdomyosarkómu a (2) možné vzájomné interakcie liečiv a ich biodistribúciu u holej myši a v nádorovom xenografe.

In vitro: Účinok každého z dvoch liečiv alebo ich kombinácie bol vyhodnotený po 1-hodinovej expozícii pomocou klonogénnej kvantifikácie. Samotný ET-743 alebo DXR vykazovali protinádorovú aktivitu u bunečnej línie TE 671. Kombinácia, v súlade s izobologramom a kombinačným indexom, mali pri najmenšom aditívny účinok u niekoľkých nádorových línií, vrátane TE 671.

In vivo: Bolusové i.v. dávky (ET-743, 0,1 mg/kg; DXR, 10 mg/kg) boli podané holej myši v okamžiku, keď tumor dosahoval približne 100 mg. Hodnoty poklesu hmotnosti tumoru/ \log_{10} počtu zaniknutých buniek boli 46%/0,132 u samostatnej aplikácie ET-743, 50%/0,33 u samostatnej aplikácie DXR, 77%/0,924 u súčasnej aplikácie ET-743 a DXR, 82%/1,12 po kombinovanej aplikácii ET-743 1 hodinu pred DXR a 75%/0,85 po kombinovanej aplikácii ET-743 1 hodinu po DXR. Synergický účinok bol tiež pozorovaný u myšieho fibrosarkómu UV2237 a u jeho multirezistentného subtypu UV2237/ADR.

Tieto dáta ukazujú synergický účinok ET-743/DXR a tento účinok sa zdá byť v ďalšom vývoji nezávislý na poradí aplikácie liečiv aj na kombinácii. Plazmatická koncentrácia ani koncentrácia DXR v tumore sa významne nelíši pri samotnej aplikácii DXR alebo v kombinácii s ET-743. Vyhodnotenie farmakokinetiky (FK) ET-743 pri izolovanom podaní alebo v kombinácii s DXR sa študuje. Kombinácia ET-743 a DXR sa chová doplnkovo *in vitro*, avšak synergicky *in vivo* u rhabdomyosarkómu TE 671. FK profil DXR nie je ovplyvnený súčasným podaním ET-743. Tieto dáta poskytujú dôvod na vykonanie iniciálnych klinických skúšok na použití tejto kombinácie.

Príklad 8: ET-743 a cisplatina (DDP) vykazujú *in vitro* a *in vivo* synergický účinok u bunčných línií ľudského sarkómu a karcinómu ovaria

V tomto prípade ukazujeme, že ET-743 zvyšuje účinnosť DDP pri použití *in vitro* aj *in vivo*. V prípade niekoľkých nádorových línií zahrnujúcich ľudský karcinóm čreva (HCT116), karcinóm ovaria (Igrov-1, A2780), ich rezistentné subtypy (Igrov-1/PSC-ET a 1A9, respektíve) a rabdomyosarkóm (TE671) by nižšie koncentrácie samostatne aplikovaného ET-743 mohli až dvojnásobne zvýšiť účinok DDP. Koncentrácie odpovedajúce IC30/IC50 pre ET-743 vedú k doplnkovému alebo synergickému účinku. Tieto výsledky vyústilo v *in vivo* štúdiu s použitím xenograftových modelov s cieľom skúmania účinných kombinácií liečiv s ET-743.

U s.c. transplantovanej TE671, ktorá je čiastočne citlivá k samotnému ET-743 a DDP, kombinácie týchto dvoch liečiv vytvorila omnoho väčší protinádorový účinok než bol dosiahnutý pri samotnom použití každého z týchto liečiv v ich MTD hodnotách. U ovariálneho tumoru, ktorý je za normálnych podmienok rezistentný k ET-743 aj DDP pri izolovanom použití, vytvorila ich kombinácia rastovú inhibíciu tumoru väčšiu než 50%. U ortotopicky transplantovaného ľudského ovariálneho karcinómu HOC8 vytvárajúcom nádorový rozsev v peritoneálnej dutine s ascitom a rezistentnom k ET-743 a len čiastočne citlivom k DDP, kombinácia týchto dvoch liečiv viedla k výraznému zvýšeniu prežitia a to dokonca pri ET-743 dávkach 0,05 mg/kg (1/4 MTD) a zároveň nespôsobila žiadnu významnú toxicitu. Pri ET-743 dávkach 0,15 mg/kg výrazne vzrástlo prežitie, ale došlo aj k nárastu toxicity prejavujúcej sa poklesom hmotnosti, ktorá bola významne vyššia než toxicita spôsobená samostatným podaním liečiv.

Tieto výsledky predkladajú závažný dôvod na naplánovanie klinických skúšok na použitie kombinácie ET-743 a DDP u sarkómov a karcinómov ovaria. *In vitro* a *in vivo* štúdie prebiehajú s cieľom objasniť mechanizmy synergického účinku medzi ET-743 a DDP u týchto typov nádorov.

Príklad 9: Vysoké dávky dexametazónu (dex) chránia pred hepatotoxickým účinkom ecteinascidínu 743 (ET-743) u krýs

ET-743, látka získaná z morských tunikátu, je v súčasnej dobe v štádiu II. fáze klinických skúšok. Vykazuje klinickú aktivitu proti sarkómom a predbežné výsledky predpokladajú účinnosť proti karcinómu prsníka a ovaria. U väčšiny liečených pacientov však dochádza k prejavom hepatotoxicity charakterizovanej zvýšením transamináz, u menšieho počtu prípadov dôjde k cholestáze. U krysy, ktorá je zo zvierat najviac citlivá, je toxicita charakterizovaná pečeňovou nekrózou a zápalom žlčovodu. Na základe protizápalového účinku dex, sme skúsili jeho vplyv na pečeňové poškodenie u krýs vyvolané ET-743. Samiciam krýs kmeňa Wistar bola i.v. aplikovaná jedna dávka ET-743 (40 µg/kg). Niektoré krysy pred aplikáciou ET-743 jednu p.o. dávku dex, 1, 5, 10 alebo 20 mg/kg za 24 hodín. Pečeňové poškodenie a plazmatické hladiny alkalickéj fosfatázy (ALP), aspartátaminotransferázy (AST) a celkového bilirubínu (TB) boli určené do troch dní od aplikácie ET-743. Bežné histologické rezy pečeňového tkaniva boli hodnotené na svetelnom mikroskope.

Dva dni po liečbe ET-743 javila pečeňové tkanivo krýs, ktoré obdržali samotný ET-743, známky zápalu žlčovodov, výrazne degeneratívne zmeny epitelu žlčovodov a boli patrné okrsky nekrózy pečeňového tkaniva. Plazmatické hladiny ALP a AST boli po dvoch dňoch významne zvýšené. Cholestázu odrážalo dramatické zvýšenie plazmatickej hladiny TB, ku ktorému došlo 2 dni po aplikácii ET-743. K histopatologickým zmenám a zvýšeniu plazmatického ALP, AST a TB vôbec nedošlo u krýs, ktoré boli predliečené dávkou 10 alebo 20 mg/kg dex.

Zatiaľ čo dex v dávke 1 mg/kg bol protektívne len málo, dávka 5 mg/kg mala už miernu protektivitu. Plazmatické hladiny ET-743 u krýs, ktoré obdržali každý deň dex (50 mg/kg) po celkovú dobu troch dní pred aplikáciou ET-743, neboli znížené v porovnaní s krysami liečenými len samotným ET-743. Navyše, účinnosť ET-743 proti melanómu implantovanému myši nebola dexametazónom narušená. Tieto výsledky ukazujú, že zaradenie vysokých dávok dexametazónu do ET-743 liečebného protokolu môže znížiť jeho hepatotoxicitu u pacientov liečených na nádor.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie ET-743 k výrobe lieku na účinnú protinádorovú liečbu pomocou kombinovanej terapie využívajúcej ET-743 s iným liečivom.
2. Použitie liečiva k výrobe lieku na účinnú protinádorovú liečbu pomocou kombinovanej terapie využívajúcej toto liečivo s ET-743.
3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, kde kombinácia ET-743 a liečiva pôsobí synergicky.
4. Použitie podľa nároku 1, 2 alebo 3, kde ET-743 je súčasťou rovnakého lieku alebo je k dispozícii ako samostatný liek na aplikáciu v rovnakom alebo inom okamžiku ako dané liečivo.
5. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, keď kombinovaná terapia používa ET-743 a antracyklín.
6. Použitie podľa nároku 5, keď kombinovaná terapia používa ET-743 a doxorubicín.
7. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 4, keď kombinovaná terapia používa ET-743 a platínové zlúčeniny s protinádorovým účinkom.
8. Použitie podľa nároku 7, keď kombinovaná terapia používa ET-743 a cisplatinu.
9. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, keď kombinovaná terapia používa ET-743 a dexametazón.
10. ET-743 a protinádorové liečivo, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že má synergický účinok s ET-743 po podaní pacientovi s tumorom.