



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **329981**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/4995 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20032027	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.11.06 PCT/GB2001/04902
(22)	Inng.dag	2003.05.06	(85)	Videreføringsdag	2003.05.06
(24)	Løpedag	2001.11.06	(30)	Prioritet	2000.11.06, US, 246233 2000.11.13, US, 248095 2001.10.19, US, 345982
(41)	Alm.tilgj	2003.07.04			
(45)	Meddelt	2011.01.31			
(73)	Innehaver	Pharma Mar SA, Calle de la Calera, 3, Polígono Industrial de Tres Cantos, ES-28760 MADRID, Spania			
(72)	Oppfinner	Steve Weitman, c/o Institute for Drug Development, CTCR, 14960 Omicron, San Antonio, TX 78245-3217, US-, USA Naoto Takahashi, Memorial Sloan Kettering, 1275 York Avenue, New York, NY 10021, US-, USA Maurizio D'Incalci, c/o Institute de la Recherche Farmacologique Mario Negri, Milano, IT-, Italia Glynn Thomas Faicloth, c/o PharmaMar USA Inc, 320 Putnam Avenue, Cambridge, MA 02139-4616, US-, USA Rafaella Giavazzi, c/o Institute de la Recherche Farmacologique Mario Negri, Milano, IT-, Italia Andreas Gescher, 7 Swithland Court, Brand Hill, Woodhouse Eaves LE12 8SS, England, GB-, Storbritannia			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Anvendelse av ET-743 ved fremstilling av et medikament, samt synergistisk kombinasjon som omfatter ET-743 og et annet antitumorlegemiddel.			
(56)	Anførte publikasjoner	US 5256663 A, WO 0069441 A1			
(57)	Sammendrag				

ET-743 anvendes for fremstilling av et medikament for effektiv behandling av en tumor ved hjelp av kombinasjonsterapi under anvendelse av ET-743 sammen med en annen medisin.

Den foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av ET-743 ved fremstilling av et medikament, samt synergistisk kombinasjon som omfatter ET-743 og et annet antitumorlegemiddel.

5 Ecteinascidin 743, ET-743, er et anticancermiddel avledet fra en marin kilde.

Oppfinnelsens bakgrunn

10 Leseren henvises til WO 0069441 publisert 23. november 2000 for informasjon om sammensetninger og anvendelser av ET-743 for behandling av cancer. Det antydes der ikke noe om en synergistisk virkning mellom ET-743 og de andre komponentene.

US 5 256 663 angår forbindelser ekstrahert fra Ecteinascidin turbinate innbefattende ET-743. Publikasjonen 15 beskriver i detalj isolering av ET-743 og dens struktur. Det angis også at ecteinascidin har biologisk aktivitet overfor bakterier og cytotoxiske egenskaper. Det er imidlertid ingen beskrivelse av den synergistiske kombinasjon som definert ved foreliggende oppfinnelse.

20

Oppsummering av oppfinnelsen

I overensstemmelse med én side av oppfinnelsen tilveiebringer vi effektive kombinasjonspreparater basert på ecteinascidin 743 under anvendelse av andre antitumormedisiner. 25 De andre medisiner kan danne del av det samme preparat eller tilveiebringes som et separat preparat for administrering samtidig eller til en annen tid. Identiteten til den andre medisiner er valgt fra cisplatin, paclitaxel, gemcitabin, 7-etyl-10-hydroksycamptotecin (SN-38), trimetrexat, doxorubicin og 30 vinblastin.

Videre er oppfinnelsen rettet på anvendelse av ET-743 ved fremstilling av et medikament for effektiv behandling av en tumor i kombinasjonsterapi under anvendelse av ET-743 i synergistisk kombinasjon med et annet antitumorlegemiddel valgt 35 fra cisplatin, paclitaxel, gemcitabin, 7-etyl-10-hydroksycamptotecin (SN-38), trimetrexat, doxorubicin og vinblastin.

Som del av denne patentbeskrivelse innbefatter vi en serie med eksempler og refererer nå til disse. Disse eksempler påviser den økte effektivitet av ET-743 når den anvendes i kom-

binasjon med andre medisiner, og angår forskjellige kombinasjoner under anvendelse av ET-743.

Eksempel 1 angår effektive kombinasjoner av ET-743 og doxorubicin for tumorvekstinhiberinger mot marine og humane sarkomer i atymiske mus.

Eksempel 2 viser at ecteinascidin 743 (ET-743) og doxorubicin produserer synergistiske, cytotoksiske effekter i mykvevssarkomlinjer HT-1080 og HS-18.

Disse to eksempler viser mer enn additive effekter av kombinasjonen av ET-743 og doxorubicin, som er mer effektiv enn hvert av disse alene mot humane tumorer (i disse spesifikke eksperimenter, sarkom), idet disse effekter finner sted uavhengig av administreringsrekkefølgen. Slike resultater viser at de klart er lovende for behandling av pasienter.

Eksempel 3 viser en synergistisk, cytotoksisk effekt av ET-743 og cisplatin.

Eksempel 4 gir en rekkefølgeevaluering av ET-743 i kombinasjoner med kjemoterapimidler mot et panel av humane tumorcellelinjer, spesielt ET743-kombinasjoner med doxorubicin, taxol, SN-38, cisplatin og gemcitabin.

Disse to viser mer enn additive effekter av kombinasjonen av ET-743 med platina-antitumorforbindelsen cisplatin sammen med nukleosidanalogen gemcitabin, og med en inhibitor av topoisomerase II (SN38 som er det aktive middel fremstilt fra promedisin CPT-11 som er en medisin i camptotecingruppen). Disse kombinasjoner er igjen mer effektive enn hver medisin alene mot humane tumorer (ved disse spesifikke eksperimenter mot en rekke forskjellige tumorceller: eggstokk, colon, lunge, bryst, ben-sarkom), idet disse effekter var avhengige av eksponeringsrekkefølgen i enkelte tilfeller. Det virker igjen lovende for behandling av pasienter.

Interessant nok var synergistisk virkning klart ikke forutsigbar: Eksempel 4 indikerer at for de fleste undersøkte kombinasjoner ble ingen synergisme iaktatt (i virkeligheten ble antagonisme rapportert i enkelte tilfeller).

Eksempel 5 angår evaluering av kombinasjoner av ET-743 med doxorubicin eller trimetrexat eller paclitaxel.

Det viser mer enn additive effekter av kombinasjonen av ET-743 med antrasykliner (spesielt doxorubicin) som er mer effek-

tiv enn hver av dem alene mot humane tumorer (i disse spesifikke eksperimenter, sarkom), idet disse effekter finner sted uavhengig av administreringsrekkefølgen. Slike resultater gir klare løfter for behandling av pasienter.

5 Eksempler 6-8 forsterker og kompletterer de tidligere eksempler og viser spesielt synergien av ET-743 og doxorubicin og også ET-743 med cisplatin.

Eksempel 9 demonstrerer en forskjellig type av effektivitet for kombinasjonene ifølge denne oppfinnelse hvor høydose-dexametason beskytter mot hepatotoksisitet til ecteinascidin-743 (ET-743).

Som en konklusjon tilveiebringer denne oppfinnelse derfor kombinasjoner og anvendelsen av ET-743 for fremstilling av et medikament for behandling av en tumor i kombinasjonsterapi.

15 Kombinasjonen ifølge den foreliggende oppfinnelse kan således anvendes i en metode for behandling av ethvert pattedyr, nærmere bestemt et menneske, som er angrepet av cancer, hvilken omfatter administrering til det angrepne individ av en terapeutisk effektiv mengde av kombinasjonen.

20 Eksempler på kombinasjonen ifølge oppfinnelsen innbefatter ethvert fast stoff (tabletter, piller, kapsler, granuler, etc.) eller væsker (oppløsninger, suspensjoner eller emulsjoner) med egnet sammensetning for oral, topisk eller parenteral administrering, og de kan inneholde den rene
25 forbindelse eller i kombinasjon med en hvilken som helst bærer eller andre farmakologisk aktive forbindelser. Disse preparater kan måtte være sterile når de administreres parenteralt.

Administrering av forbindelsene eller preparatene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan foretas ved hjelp av en
30 hvilken som helst egnet metode, så som intravenøs infusjon, orale preparater, intraperitoneal og intravenøs administrering. Vi foretrekker at infusjonstider av opp til 24 timer anvendes, mer foretrukket 2-12 timer, og med 2-6 timer som mest foretrukket. Korte infusjonstider som gjør det mulig at behandlingen kan
35 utføres uten å måtte bli over natten på sykehuset, er spesielt ønskelige. Infusjonen kan imidlertid være fra 12 til 24 timer eller enda lenger om nødvendig. Infusjon kan utføres i egnede intervaller av ca. 2 til 4 uker. Farmasøytiske preparater som inneholder forbindelser ifølge oppfinnelsen, kan leveres ved

hjelp av liposom- eller nanosfæreinnkapsling, i blandinger med opprettholdt frigjøring eller ved hjelp av andre standardleveringsmidler.

Den korrekte dose av forbindelsene vil variere i overensstemmelse med den spesielle sammensetning, anvendelsesmetoden og det spesielle sted, vert og tumor som behandles. Andre faktorer som alder, kroppsvekt, kjønn, diett, administreringstid, ekskresjonshastighet, vertens tilstand, medisinkombinasjoner, reaksjonsømfintligheter og sykdommens grad av alvor, skal tas i betraktning. Administrering kan utføres kontinuerlig eller peridisk innenfor den maksimale tolererte dose.

Kombinasjonene ifølge denne oppfinnelse kan anvendes på refraktære pasienter. Leseren henvises til WO 0069441 for informasjon angående doseringsskjemaer for ET-743 og annen bruksinformasjon for kombinasjonen ifølge denne oppfinnelse.

Eksempler ifølge oppfinnelsen

Eksempel 1

Effektive kombinasjoner av ET-743 og doxorubicin for hemming av tumorvekst mot murine og humane sarkomer hos atymiske mus

ET-743 har bekreftet klinisk aktivitet hos pasienter med myk- og bensarkom som er refraktært overfor tidligere kjemoterapi, innbefattende Doxorubicin (Dx) og Isosfamid. Tatt i betraktning den potensielle kliniske verdi ved å kombinere ET-743 med Dx, har vi undersøkt denne kombinasjon mot det murine fibrosarkom UV2237, dets mdr-resistente underlinje UV2237/ADR og den humane rhabdomyosarkomzenograft TE671. Både ET743 og Dx alene var effektive mot murint UV2237 fibrosarkom, mens hver var inaktiv eller marginalt aktiv mot både UV2237/ADR og TE671. Kombinasjonen av ET743 og Dx var imidlertid effektiv for alle 3 modeller. Synergismen var spesielt markert ved humant rhabdomyosarkom TE671 og forekom å være uavhengig av medisinerkefølge eller kombinasjon.

Etter enkle i.v. behandlinger utført da tumoren TE671 var ca. 100 mg, var tumorveksthemming (TWI = "tumor weight inhibition") og Log₁₀ Cell Kill- (LCK) verdier henholdsvis 46% og 0,132 for ET-743 (0,1 mg/kg) alene, 50% og 0,33 for Dx (10 mg/kg) alene, 77% og 0,924 for ET-743 (0,1 mg/kg) og Dx (10 mg/kg) gitt samtidig, 82% og 1,12 for kombinasjonen av ET-743 (0,1 mg/kg)

gitt 1 time før Dx (10 mg/kg) og 75% og 0,85 for kombinasjonen av ET-743 (0,1 mg/kg) gitt 1 h etter Dx (10 mg/kg).

Disse data indikerer at kombinasjonen av ET-743 og Dx også kan være effektiv i tumorer som ikke er ømfintlige eller marginalt ømfintlige overfor disse medisiner gitt alene, og tilveiebringer således et sterkt insitament for kliniske undersøkelser under anvendelse av denne kombinasjon.

Eksempel 2

10 Ecteinascidin 743 (et-743) og doxorubicin produserer synergistiske, cytotoksiske effekter i mykvevssarkomlinjer HT-1080 og HS-18

To sarkomcellelinjer, HT 1080, en fibrosarkomcellelinje ømfintlig mot ET-743 ($IC_{50} = 10 \text{ pm}$) og HS-18, en liposarkomcellelinje, mindre ømfintlig mot ET-743 ($IC_{50} = 270 \text{ pm}$), ble evaluert for toksisitet overfor ET-743 i kombinasjon med enten doxorubicin, trimetrexat eller paclitaxel. Da ET-743 ble anvendt i kombinasjon med hver av disse medisiner i et konstant molforhold og analysert ved hjelp av metoden til Chou og Talalay, ble synergistiske effekter oppnådd (72 h inkubasjon) med kombinasjonen ET-743-doxorubicin, men ikke med kombinasjon av ET-743 med trimetrexat eller paclitaxel. Da celler ble eksponert for ET-743 i 72 timer og enten doxorubicin, trimetrexat eller taxol i de siste 48 timer av inkubasjon, ble synergistiske effekter også oppnådd med doxorubicin mot begge sarkomcellelinjer. Det er av interesse at sekvensen paclitaxel etterfulgt av ET-743, var mer effektiv enn den motsatte sekvens. Resultatene oppmuntrer til kliniske forsøk med doxorubicin i kombinasjon med ET-743 for å behandle pasienter med mykvevssarkom da begge disse medisiner har aktivitet mot denne sykdom.

Eksempel 3

Synergistisk, cytotoksisk effekt av ET-743 og cisplatin

Ecteinascidin 743 (ET-743) har vist sterk antitumoraktivitet i flere prekliniske systemer og lovende klinisk aktivitet. ET-743 binder N2-guaniner i minorsporet og påvirker reguleringen av transkripsjon (Minuzzo et al., PNAS, vol. 97, 6780-84, 2000).

Tidligere undersøkelser har indikert at mistilpassede reparasjons- (MMR) svekkede celler er like ømfintlige mot ET-743 som perfekte celler. NER-svekkede celler som er meget ømfintlige mot cisplatin, er 6-8 ganger mindre ømfintlige mot ET-743. På basis av de forskjellige mekanismer som er involvert ved reparasjonen av ET-743 og cisplatin og på grunn av den potensielle kliniske interesse for denne kombinasjon, har vi utført undersøkelser for å evaluere de cytotoksiske effekter av ET-743 og cisplatin for flere humane tumorcellelinjer. Human eggestokk-
kreft Igrove-1-cellelinje, en underlinje som er motstandsdyktig mot ET-743 (IG/PSC/ET), human colonkreft HCT 116, (MMR-svekket) og HCT11-ch3 (MMR-perfekt) cellelinjer ble anvendt for denne undersøkelse.

Cellene ble behandlet i 1 eller 24 h med forskjellige konsentrasjoner av ET-743 eller cisDDP, alene eller i kombinasjoner, og cytotoksisiteten ble evaluert ved anvendelse av kolorimetrisk prøver etter farging med sulforhodamin B. I alle cellelinjer ble en synergistisk effekt iaktatt både med eksponering i 1 h eller 24 h. Av interesse var ET-743 i HCT116 som er motstandsdyktig mot cisDDP, tilsynelatende i stand til å reversere ømfintligheten selv i konsentrasjoner av ET-743 som alene var marginalt effektive. Vurdert samlet, tilveiebringer dataene en fornuftig grunn til å utføre kliniske undersøkelser ved kombinasjon av ET-743 med cisDDP.

25

Eksempel 4

ET743-kombinasjoner med doxorubicin, taxol, SN-38, cisplatin og gemcitabin

ET-743 ble evaluert i kombinasjon med doxorubicin, taxol, SN-38, cisplatin og gemcitabin mot et panel av humane tumorcellelinjer. Disse undersøkelser var beregnet på å skulle bestemme typen av gjensidig medisin-medisinivirkning mellom ET-743 og standard kjemoterapimidler og eksponeringsrekkefølgens påvirkning på antitumoraktivitet. Mange kombinasjoner av ET-743 med standard cytotoksiske midler ble anvendt med et modellfritt program (Laska et al., Biometrics 50:834, 1994) for å beskrive typen av innbyrdes medisin-medisinivirkning. Disse undersøkelser foreslår at uavhengig av eksponeringen blir et additivt mønster av innbyrdes medisin-medisinivirkning mest typisk iaktatt.

En synergistisk innbyrdes medisin-medisininvirkning ble iaktatt da ET-743 ble kombinert mot ikke-småcellet lunge (foreksponering for SN-38), osteosarkom (foreksponering med ET-743 etterfulgt av cisplatin), bryst (foreksponering for ET-743 etterfulgt av gemcitabin), colon (foreksponering med ET-743 etterfulgt av SN-38 og samtidig eksponering med SN-38) -tumorcellelinjer. Et additiv/synergistisk (foreksponering for ET-743 etterfulgt av SN-38 mot NSCL-; foreksponering for SN-38 mot colon- og NSCL-; samtidig eksponering med cisplatin mot osteosarkom- og med SN-38 mot NSCL-linjer) mønster av innbyrdes medisin-medisininvirkning ble iaktatt. Tegn til antagonisme ble notert da taxol ble anvendt samtidig mot to NSCL-linjer og doxorubicin mot en rhabdomyosarkomcellelinje.

Disse undersøkelser indikerer at ET-743 som er i fase II av kliniske forsøk, ville kunne kombineres med flere cytotoxiske midler mot et bredt område av tumortyper.

Materiale og metoder

20 Cellekultur:

Human bryst (MDA-435, MDA-231, T-470)-, ikke-småcellet lunge (NCI-H522, NCI-H226, NCI-H23)-, colon (HCT-116, HT-29, Colo-320)-, osteosarkom (HOS, U-2, OS, SaOS-2)-, rhabdomyosarkom (RH1, RH30, RD)-tumorcellelinjer ble dyrket i RPMI-1640 supplert med 10% føtalt bovins serum og 2 mM L-glutamin. Alle lagerkulturer ble oppbevart i 75 cm² kolber ved 37 °C i fuktighetsholdige inkubatorer med en atmosfære av 5% CO₂-95% luft.

IC₅₀-analyse:

30 Et forhåndsbestemt antall eksponentielt voksende tumorceller ble inokulert i vevsdyrkningsplater med 96 fordypninger og ble stabilisert i 24 timer. Etterpå ble en medisinplate som besto av seriefortynnete konsentrasjoner av ET-743 eller standard kjemoterapimidler, tilsatt til cellene. Celler ble inkubert som en 24-timers eksponering i 3 dager etterfulgt av tilsetning av MTT i 4 timer. De resulterende formazankrystaller ble deretter gjort oppløselige med syre/alkohol og absorbans (570 nm-test/630 nm-referanse) bestemt under anvendelse av en mikroplate-

leser. Resultater ble uttrykt som prosentuell tumorcelledreping sammenlignet med mediakontroller.

Kombinasjonsundersøkelser:

5 For kombinasjonsundersøkelsene ble det konsentrasjons-skjema (uttrykt som prosent av de enkelte midlers IC_{50}) anvendt for å karakterisere typen av innbyrdes virkning, vist nedenfor:

Medisinsk konsentrasjon (uttrykt som prosent av IC_{50})	
ET-743	Standardmidler
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

10

Statistisk analyse av kombinasjonsundersøkelser:

Statistiske sammenligninger foretas med hver test-kombinasjon (75:25-ET-743/standardmidler) og sluttpunktene (100:0-ET-743 og 0:100-standardmidler). En statistisk signifikant
 15 observasjon krever at en forskjell foreligger mellom kombinasjons- (ET-743 og standardmidler) absorpsjonsverdi og begge sluttpunktverdier (ET-743 og standardmidler alene). Dersom hovedparten av (≥ 3 av 5) verdiene er statistisk over eller under linjen, er henholdsvis antagonisme eller synergi beskrevet. Ellers er
 20 mønsteret mer i overensstemmelse med en additiv innbyrdes virkning. Fortolkning er meget vanskelig dersom det er en betraktelig helning til linjen som forbinder sluttpunktene. Dersom helningen til IC_{50} -kurvene for de individuelle midler er identiske (usannsynlig), kan man til tider bestemme typen av interaksjon.

25

<u>Sekvenseringskombinasjoner av ET-743 med kjemoterapimidler</u>		
<u>Tumor</u> <u>Type/cellelinje</u>	<u>Eksposeringstil-</u> <u>stander/midler</u>	<u>Medisin-medisin-</u> <u>interaksjoner</u> <u>observert</u>
<u>Osteosarkom</u>		
NOS	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for cisplatin 24 timer cisplatin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/cisplatineksponering	Synergistisk Additiv Additiv
U2-OS	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for cisplatin 24 timer cisplatin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/cisplatineksponering	Additiv Additiv Additiv
Sa06	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for cisplatin 24 timer cisplatin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/cisplatineksponering	Additiv Additiv Additiv/synerg- istisk
<u>Ikke-små-cellet</u> <u>lunge</u>		
NCB-H226	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for taxol 24 timer taxol fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/taxoleksponering	Additiv Additiv Antagonistisk

	<p>24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN38</p> <p>24 timer SN-38 fulgt av 24 timers eksponering for ET-743</p> <p>24 timer samtidig ET- 743/SN-38-eksponering</p>	<p>Additiv/synerg- istisk</p> <p>Additiv/synerg- istisk</p> <p>Additiv</p>
NCB-N522	<p>24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for taxol</p> <p>24 timer taxol fulgt av 24 timers eksponering for ET-743</p> <p>24 timer samtidig ET- 743/taxoleksponering</p> <p>24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN38</p> <p>24 timer SN-38 fulgt av 24 timers eksponering for ET-743</p> <p>24 timer samtidig ET- 743/SN-38-eksponering</p>	<p>Additiv</p> <p>Additiv</p> <p>Antagonistisk</p> <p>Additiv/synerg- istisk</p> <p>Additiv/synerg- istisk</p> <p>Additiv</p>
NCB-N23	<p>24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for taxol</p> <p>24 timer taxol fulgt av 24 timers eksponering for ET-743</p> <p>24 timer samtidig ET- 743/taxoleksponering</p> <p>24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN38</p> <p>24 timer SN-38 fulgt av 24 timers eksponering for ET-743</p>	<p>Additiv/antagon- istisk</p> <p>Additiv</p> <p>Antagonistisk</p> <p>Additiv</p> <p>Synergistisk</p>

	24 timer samtidig ET-743/SN-38-eksponering	Additiv/synergistisk
<u>Bryst</u>		
MDA-435	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for gemcitabin 24 timer gemcitabin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET-743/gemcitabin	Additiv Additiv Additiv
MDA-231	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for gemcitabin 24 timer gemcitabin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET-473/gemcitabin	Additiv Additiv Additiv
T47-8	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for gemcitabin 24 timer gemcitabin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET-473/gemcitabin	Additiv Additiv Additiv
<u>Colon</u>		
MCT-116	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN-38 24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN-38 24 timer samtidig ET-743/SN-eksponering	Synergistisk Additiv Additiv
NT-29	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN-38	Additiv

	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN-38 24 timer samtidig ET- 743/SN-eksponering	Additiv Additiv
Colo-320	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN-38 24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for SN-38 24 timer samtidig ET- 743/SN-eksponering	Additiv Additiv/synerg- istisk Synergistisk
<u>rhabdomyosarkom</u>		
RN1	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for doxorubicin 24 timer doxorubicin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/doxorubicineksponering	Additiv Additiv Antagonistisk
RD	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for doxorubicin 24 timer doxorubicin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/doxorubicineksponering	Additiv Additiv Additiv/antagon- istisk
RN30	24 timer ET-743 fulgt av 24 timers eksponering for doxorubicin 24 timer doxorubicin fulgt av 24 timers eksponering for ET-743 24 timer samtidig ET- 743/doxorubicineksponering	Additiv Additiv Antagonistisk

Oppsummering

Disse undersøkelser indikerer at uavhengig av eksponeringssekvensen mellom ET-743 og standard kjemoterapimidler blir et additivmønster av medisin-medisininteraksjon mest typisk observert.

Tegn på synergi ble observert da NC1-H522- og NC1-H23 NSCL-linjer ble forhåndseksponert for SN-38, forhåndseksponert for ET-743 med cisplatin mot HOS-osteosarkom, T-470 brystcellelinje med gemcitabin, SN-38 mot HCT-116-colon og samtidig eksponering med SN-38 mot Colo-320-colontumorcellelinje.

Tegn på antagonisme ble observert da taxol ble anvendt samtidig mot NC1-H226- og NC1-H23 NSCL-cellelinjen og doxorubicin mot RHI-rhabdomyosarkomtumorcellelinjen.

Eksempel 5

Interaksjon mellom ET-743 og andre antineoplastiske midler

Selv om ET-743 for tiden befinner seg i kliniske forsøk fra humane kreftformer, er mekanismene for antitumoraktiviteten til ET-743 ikke blitt fullstendig utredet. Målet med denne undersøkelse var å fastslå arten av interaksjon mellom ET-743 og andre antineoplastiske midler (doxorubicin; DXR, trimetrexat; TMTX og paclitaxel; taxol) under anvendelse av kombinasjonsindeks- (CI) metoden til Chou og Talalay. For bedre å forstå hvorledes ET-743 kan anvendes klinisk, ble det med den foreliggende undersøkelse anvendt SRB-analyser for å undersøke cytotoxisiteten som skrives fra å kombinere ET-743 med tre andre antineoplastiske midler i henhold til de forskjellige administreringsprogrammer i to mykvevssarkomcellelinjer, HT-1080 og HS-18, *in vitro*. DXR var det eneste middel som resulterte i sekvensuavhengig synergi da det ble kombinert med ET-743. Samtidig eksponering av ET-743 med DXR resulterte i synergistiske interaksjoner i begge cellelinjer.

CI-ene (middel) med programmet var hhv. 0,86, 0,83, 0,84 og 0,85 ved 50, 75, 90 og 95% celledreping i HT-1080-celler og hhv. 0,89, 0,74, 0,64 og 0,60 ved 50, 75, 90 og 95% celledreping i HS-18-celler. Sekvensering med ET-743 i 24 h før DXR var det mest effektive system mot begge cellelinjer. Det resulterte i konstant lave CI av opp til det ca. 90% celledrepingsnivå for begge cellelinjer. Eksponering for taxol før ET-743 var også et effektivt system. Disse resultater foreslår at kombinasjonen

av ET-743 og DXR bør undersøkes ytterligere ved kliniske forsøk ved behandling av mykvevssarkom.

Materialer og metoder

5

Kjemikalier

ET-743 ble levert av Pharma-Mar S.A. (Tres Cantos, Madrid, Spania) og ble tilberedt som en 2 mM lageroppløsning i dimetylsulfoksid. Paclitaxel og DXR ble oppnådd fra Sigma
10 Chemical Co. (St. Louis, MO). TMTX ble levert av Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich).

Cellekultur

Mykvevssarkomcellelinjer, HT-1080 og HS-18, ble opp-
15 rettholdt som monolagskulturer i RP<I-1640 som inneholdt 10% føtalt bovins serum.

SRB-cytotoksisitetsanalyse

Cytotoksisitet overfor medisiner ble bestemt ved hjelp
20 av SRB-cytotoksisitetsanalyse utført i mikrotiterplater med 96 fordypninger som beskrevet. Celler ble platet ut i duplikatfordypninger (5 000 celler/fordypning) og eksponert for medisiner i forskjellige konsentrasjoner. Celler ble fiksert med 50% TCA-oppløsning i 1 h, og 0,4% SRB (Sigma) ble tilsatt til hver
25 fordypning. Etter en inkubasjon på 30 min ble platen vasket med 1% eddiksyre og avlest ved 570 nm på en Biowhiter mikroplateleser 2001. Fordypningene med celler som ikke inneholdt medisiner og med medium pluss medisiner men ingen celler, ble anvendt som
hhv. positive og negative kontroller.

30

Samtidig eksponering for ET-743 og DXR, TMTX eller paclitaxel

Celler ble kimsådd i plater med 96 fordypninger som tidligere beskrevet. Celler ble behandlet med syv forskjellige konsentrasjoner av de enkelte medisiner eller kombinasjonsbland-
35 inger i 1:100 (ET-743:de andre medisiner) molforhold. Etter eksponering i 72 h ble veksthemming målt under anvendelse av SRB-analysen.

Sekvensiell eksponering for ET-743 og DXR, TMTX eller paclitaxel

Under anvendelse av det samme forsøksprogram som er beskrevet ovenfor, eksponerte vi celler for tre forskjellige konsentrasjoner av medisiner som representerer hhv. IC₂₅, IC₅₀,
 5 IC₇₅ til ET-743, DXR, TMTX og paclitaxel. Etter 24 timers for-
 behandling med ET743- eller kombinasjonsmedisinen, ble de andre
 medisiner tilsatt til de respektive fordypninger i 48 h. Vekst-
 hemming ble bestemt under anvendelse av SRB-analysen.

10 Cellesyklusanalyse

Eksponentielt dyrkede celler ble behandlet med eller uten medisiner i flere timer. Celler ble deretter oppsamlet og fiksert med iskald 70% metanol. DNA ble farget med propidiumjodid som tidligere beskrevet. 10 000 fargede celler ble analysert på
 15 et fluorescensaktivert cellosteringsapparat (FACS = fluorescence-activated cell sorter) av fabrikat Becton Dickinson.

Bestemmelse av synergisme og antagonisme og konstruksjon av isobologrammer

20 CI ble beregnet ved hjelp av Chou-Talalay-ligningen som tar hensyn både til styrken (D_m eller IC₅₀) og formen til dose-
 virkningskurven (m-verdien). Den generelle ligning for det klassiske isobologram (CI = 1) er gitt ved:

$$25 \quad CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

hvor (Dx)₁ og (Dx)₂ i nevnerne er dosene (eller konsentrasjoner) for D₁ (ET-743) og D₂ (en annen medisin) alene som gir X %
 hemming, mens (D)₁ og (D)₂ i tellerne er doser av ET-743 og en
 30 annen medisin i kombinasjon som også hemmet X % (dvs. iso-
 effektiv). CI < 1, CI = 1, CI > 1 indikerte hhv. synergisme,
 additiv effekt og antagonisme.

(Dx)₁ eller (Dx)₂ kan lett beregnes ut fra medianeffekt-
 ligningen til Chou og Chou et al.:

$$35 \quad Dx = D_m [fa / (1-fa)]^{1/m} \quad (B)$$

hvor D_m er medianeffektdosen som oppnås fra antilogaritmen til X-avskjæringen av medianeffekt-diagrammet, X-log (D) mot Y-log

[$f_a/(1-f_a)$] eller $D_m = 10^{-(Y\text{-avskjæring})/m}$, og m er helningen til medianeffektdiagrammet. Datamaskinprogram fra Chou og Chou muliggjør automatisert beregning av m-, D_m -, D_x - og CI-verdier. Ut fra (D_m)₁, (D_x)₂ og $D_1 + D_2$ blir det lett å konstruere isobologrammer
5 automatisk basert på ligning A.

For konservative gjensidig ikke-utelukkende isobologrammer av to midler tilføyes et tredje uttrykk,

$$(D_1)(D_2)/(D_x)_1(D_x)_2 \quad (C)$$

10 til ligning A.

For enkelhets skyld blir det tredje uttrykk vanligvis utelatt, og den gjensidig eksklusive antakelse eller det klassiske isobologram blir således indikert. I Resultat 2 og 3 er CI-verdiene oppnådd fra den klassiske (gjensidig eksklusive)
15 beregning gitt.

Resultat 1

Cytotoksisitet til fire medisiner på HT-1080 og S18			
		IC ₅₀ for humane mykvevssarkomceller	
		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

20 Denne tabell viste at både HT-1080- og S18-cellelinjer var mer følsomme overfor ET-743 enn andre antineoplastiske midler.

Virkning av hvert middel på cellesyklusfordelingen mot HS-18-celler					
24 h og 72 h etter behandling med ca. IC ₅₀ -dose					
Medisiner	Dose	HR	% G1	% S-fase	% G2-M
Kontroll			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 μ M	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

Virkning av hvert middel på celledyklusfordelingen mot HT-1080-celler					
24 h og 72 h etter behandling med ca. IC ₅₀ -dose					
Medisiner	Dose	HR	% G1	% S-fase	% G2-M
Kontroll			47,5	35,8	16,7
ET-743	10 pM	24	42,6	36,1	21,3
		72	83,1	10,2	6,7
DXR	25 nM	24	36,1	17,5	46,4
		72	46,2	5,3	48,5
TMTX	6 nM	24	31,9	56,8	11,3
		72	32,0	53,7	14,4
Paclitaxel	1,3 nM	24	45,4	37,3	17,3
		72	86,0	9,0	5,0

Resultat 2 viser CI for hhv. HT-1080- og HS-18-celler som samtidig ble eksponert for ET-743 og én av antineoplastiske medisiner, som DXR, TMTX eller paclitaxel, i en kombinasjonsblanding i et molforhold av 1 til 100. Når celler ble behandlet med ET-743 og DXR, var CI-verdiene alle under 1, hvilket indikerer synergismeeffekt i begge cellelinjer. CI (middel) ved dette program var hhv. 0,86, 0,83, 0,84 og 0,85 ved 50, 75, 90 og 95% celledreping i HT-1080-celler og hhv. 0,89, 0,74, 0,64 og 0,60 ved 50, 75, 90 og 95% celledreping i HS-18-celler. Dette resultat viste at samtidig behandling av ET-743 og DXR produserte synergistisk, cytotoxisk effekt. I motsetning til dette ble antagonistisk, cytotoxisk effekt observert da celler ble behandlet med ET-0743 og TMTX eller paclitaxel.

CI-kurven ble oppnådd fra begge cellelinjer som til å begynne med ble eksponert for ET-743 i 24 h etterfulgt av DXR i 48 h. I begge cellelinjer viste ET-743 etterfulgt av DXR-behandling synergistisk, cytotoxisk effekt, og CI-verdien til HT-1080 ved 80% celledrepingsnivå var $0,64 \pm 0,12$ og den til HS-18 ved 88% celledrepingsnivå var $0,24 \pm 0,06$. I motsetning til dette

viste DXR etterfulgt av ET-743-behandling (Resultat 3a, nedre figur) den gode CI-verdi med én gang, mens CI-verdien til HT-1080 ved 80% celledrepingsnivå var $1,00 \pm 0,03$, hvilket indikerer at effekten av de to midler var additiv, og i tillegg var CI ved den høyeste drapsfraksjon verre enn den for den midlere drapsfraksjon i begge celler.

Da celler ble eksponert for ET-743 etterfulgt av TMTX, viste CI-verdiene til HT-1080 nesten én eller mer enn én, hvilket indikerer at effekten av de to midler er antagonistisk eller additiv. I motsetning til dette var de til HS-18 samtlige under 0,6, hvilket demonstrerer at disse to medisiner har synergi-effekt. Da celler ble behandlet med TMTX etterfulgt av ET-743, ble additiv effekt observert i både HT-1080- og HS-18-cellelinjer.

Paclitaxel etterfulgt av ET-743-behandling, produserte synergistisk, cytotoksisk effekt. Da celler ble eksponert for paclitaxel etterfulgt av ET-743, var CI-verdien til HT-1080 ved 89% celledrepingsnivå $0,92 \pm 0,06$ og den til HS-18 ved 78% celledrepingsnivå $0,38 \pm 0,13$.

20

Oppsummering

ET-743 var meget aktivt mot humane mykvevssarkomceller, spesielt mot den ondartede fibrosarkomcellelinje HT-1080.

DXR resulterte i sekvensuavhengig synergi i kombinasjon med ET-743, men sekvensering med ET-743 etterfulgt av DXR, var mer effektiv mot begge cellelinjer.

Eksponering for paclitaxel etterfulgt av ET-743, var også et effektivt regime mot humane mykvevssarkomceller, mens samtidig eksponering var antagonistisk.

30

Eksempel 6

In vivo kombinasjoner av kjemoterapeutiske midler med ecteinascidin 743 (Et743) mot faste tumorer

Flere unike virkningsmekanismer er blitt beskrevet for Et743 innbefattende binding til det mindre spor i DNA, alkylering av N2 i guanin, transkripsjonell hemming av MDR1-gen (Jin et al., PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo et al., PNAS 97, 6780, 2000) og motvirkning av aktiveringen av nukleær reseptor SXR (Synold et al., Nature Med. 7, 584, 2001). Som et enkelt middel hemmer Et743

tumorvekst *in vivo* under oppnåelse av fullstendige remisjoner (CR) mot flere humane tumorstammer (Hendriks et al., Ann. Oncol. 10, 1233, 1999) innbefattende melanom (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), eggstokk- (HOC 22) og brystkarsinom (MX-1). Effektiviteten av Et743 i kombinasjon med medisiner som arbeider via alternative mekanismer, kan gi muligheter for å redusere toksisitetene til enhver medisin eller å potensere effektiviteten til en medisin i resistente eller tilbakefalls-kreftformer.

For denne evaluering ble flere midler, innbefattende doxorubicin (DOX; 8 mg/kg), cisplatin (DDP; 12 mg/kg) og vinblastin (VINB; 6 mg/kg), administrert før/etter Et743 (0,2 mg/kg) med 1 times forbehandling, qdx5, i én eller flere av de følgende tumorer: kondrosarkom (CSHA), osteosarkom (OSA-FH), fibrosarkom (SW684), eggstokk (MRI-H-1834), NSCL (LX-1) og renal (MRI-H-121) med aktivitet definert som < 50% T/C. I hulfiber- (HF) modellen var sekvensen av DOX, 1 h pre-Et743 gjennomført mer effektiv enn Et743 alene i kondrosarkom (6% mot 10%), fibrosarkom (33% mot 48%) og osteosarkom (20% mot 34%). Osteosarkomxenografter produserte lignende resultater av 17% mot 43%. HF-undersøkelser med DPP viste at Et743 pre-DDP var mer effektiv enn Et743 alene for eggstokk (28% mot 100%) og kondrosarkom (15% mot 19%) og ekvivalente aktiviteter ved osteosarkom (36% T/C). Xenograftdata bekrefter at sekvensen av Et743 pre-DDP er mer effektiv enn Et743 alene (35% mot 66%). Den ene unntakelse var i NSCL hvor Et743 alene ikke var aktivt (62% T/C), men DPP etterfulgt av Et743 produserte CR (<1% T/C). Ved renalxenografter var Et743 alene meget aktivt (22% T/C), men Et743 etterfulgt av VINB, ga også CR (<1% T/C). Atskilte undersøkelser ble foretatt med andre standardmidler ved bryst-, renal-, melanom- og gastriske tumorxenografter.

Eksempel 7

Preklinisk aktivitet og biofordeling av ecteinascidin 743- (ET-743) og doxorubicin- (DOX) kombinasjoner i humant rhabdomyosarkom

ET-743 er det første i en ny gruppe av antitumormidler som oppviser antitumoraktivitet. ET-743 har vist aktivitet hos pasienter med sarkom som er refraktær overfor DOX og ifosfamid. Tatt i betraktning dens potensial som en effektiv medisin, undersøkte vi (1) den prekliniske antitumoraktivitet til ET-743/DOX-

kombinasjon mot det humane rhabdomyosarkom TE 671 og (2) mulige samvirkninger mellom medisinene og deres biofordeling hos nakne mus og ved tumorxenografter.

In vitro: Virkningen av hver medisin eller kombinasjon etter eksponeringer i 1 h ble evaluert ved hjelp av klonogen- analyse. ET-743 eller DOX alene viste antitumoraktivitet overfor TE 671-celler. Kombinasjonen i henhold til isobologramanalyse og kombinasjonsindeks var i det minste additiv i flere tumorcelle- linjer innbefattende TE 671.

In vivo: Enkle iv-behandlinger (ET-743, 0,1 mg/kg; DOX, 10 mg/kg) ble administrert for nakne mus når xenografttumorer veide ca. 100 mg. Tumorvekthemming/Log10-celledrepingsverdier var 46%/0,132 for ET alene, 50%/0,33 for DOX alene, 77%/0,924 for ET- 743 og DOX gitt samtidig, 82%/1,12 for kombinasjonen av ET-743 gitt 1 h før DOX, og 75%/0,85 når ET-743 ble gitt 1 h etter DOX. En synergistisk effekt er også blitt iaktatt overfor det murine fibrosarkom UV2237 og overfor dets flermedisinresistente under- linje UV2237/ADR.

Disse data viser en synergistisk effekt av ET-743/DOX og synes å være uavhengig av medisinsekvens eller -kombinasjon ved de scenarioer som hittil er blitt undersøkt. Verken plasmaet eller tumorkonsentrasjonene av DOX er signifikant forskjellige når DOX ble gitt alene eller i kombinasjon med ET-743. Den farmakokinetiske (PK) evaluering av ET-743 gitt alene eller i kombinasjon med DOX, er på vei. Kombinasjonen av ET-743 og DOX synes additiv *in vitro*, men likevel synergistisk *in vivo* ved rhabdomyosarkom TE 671. PK-profilen til DOX påvirkes ikke av samtidig behandling med ET-743. Disse data gir en fornuftig tilskyndelse for å anvende denne kombinasjon ved tidlige kliniske forsøk.

Eksempel 8

ET-743 og cisplatin (DDP) viser *in vitro* og *in vivo* synergi overfor humane sarkom- og eggstokk-karsinomcellelinjer

Vi viser her at ET-743 forsterker aktiviteten til DDP både *in vitro* og *in vivo*. I flere kreftcellelinjer, innbefattende humant intestinalt karsinom (HCT116), eggstokk-karsinom (Igrov-1, A2780), deres resistente underlinjer (hhv. Igrov-1/PSC-ET og 1A9) og rhabdomyosarkom (TE671), kunne lavere konsentrasjoner av ET-

743 anvendt som et enkelt middel, potensere DDP-aktivitet i det minste tofoldig. Konsentrasjoner svarende til IC30/IC50 av ET-743, resulterte i enten additive eller synergistiske effekter. Disse resultater har ført til undersøkelser *in vivo* under
5 anvendelse av xenograftmodeller for å studere effektive medisinkombinasjoner med ET-743.

I sc-transplantert TE671, som var delvis følsom overfor enten ET-743 og DDP, ga kombinasjonen av de to medisiner en antitumoreffekt som var langt større enn den som ble oppnådd med
10 hver medisin anvendt i deres respektive MTD-konsentrasjoner. Eggstokk-1A9-tumoren som normalt er resistent både overfor ET-743 og DDP som midler anvendt alene, ga i kombinasjon en tumorveksthemming større enn 50%. Ortotopisk transplantert, humant eggstokk-karsinom HOC8 som produserer tumornoduler i det peritoneale
15 hulrom med ascites, som er resistent overfor ET-743 og delvis følsomt overfor DDP, resulterte i kombinasjon i en dramatisk økning i overlevelse selv ved en dose av ET-743 på 0,05 mg/kg (1/4 MTD) og forårsaket ikke noen betydelig toksisitet. En ET-743-dose på 0,15 mg/kg økte overlevelsen markert, men det forekom
20 også en økning i toksisitet som indikert ved et vekttap som var betydelig høyere enn det som ble iaktatt etter behandling med hver medisin.

Disse resultater byr på en sterkt fornuftig tilskyndelse til å utvikle kliniske forsøk under anvendelse av kombinasjonen av ET-743 og DDP for sarkomer og eggstokk-kreft. Under
25 søkelser *in vitro* og *in vivo* er i gang for å bevise de mekanismer som ligger til grunn for synergismen mellom ET-743 og DDP ved disse krefttyper.

30 Eksempel 9

Høydose-dexametason (dex) beskytter mot hepatotoksisiteten til ecteinascidin-743 (ET-743) hos rotter

ET-743 som er et middel avledet fra et marint tunikat, befinner seg for tiden i fase II av kliniske forsøk. Det har vist
35 klinisk aktivitet mot sarkomer, og foreløpige data antyder aktivitet mot bryst- og eggstokk-karsinom. Hepatotoksisitet som er kjennetegnet ved reversibel transaminittis, forekommer imidlertid hos de fleste behandlede pasienter og kolestasis hos et mindretall. Hos de fleste følsomme dyrearter, rotter, er toksisitet til

ET-743 kjennetegnet ved hepatisk nekrose og gallekanalbetennelse. Tatt i betraktning den antiinflammatoriske aktivitet til dex, undersøkte vi dets virkning på leverskade induisert av ET-743 hos rotter. Wistar-rotter av hunnkjønn mottok en enkelt iv-dose av
5 ET-743 (40 µg/kg). Enkelte rotter ble forbehandlet med en enkelt oral dose av dex enten ved 1, 5, 10 eller 20 mg/kg 24 h før ET-743-behandling. Leverpatologi og plasmakonsentrasjoner av alkalisk fosfatase (ALP), aspartataminotransferase (GOT) og totalt bilirubin (TB) ble vurdert opp til 3 dager etter adminis-
10 trering av ET-743. Vanlige histologiske seksjoner av leverne ble undersøkt ved hjelp av lysmikroskopi.

2 dager etter ET-743-behandling viste lever fra rotter som mottok ET-743 alene, gallekanalbetennelse, påfallende degen-
15 erative endringer i galleepitelceller og soner med hepatisk nekrose. Plasmanivåer av ALP og GOT ble signifikant forhøyet etter 2 dager. Kolestase viste seg ved en dramatisk økning i plasma TB-konsentrasjoner som begynte på dag 2 etter ET-743. ET-743-induserte, histopatologiske endringer og forhøyelse av plasma-ALP, -GOT og -TB var fullstendig motvirket hos rotter som
20 var forbehandlet med 10 eller 20 mg/kg dex.

Mens dex i en mengde av 1 mg/kg viste liten beskyttelse, var 5 mg/kg moderat beskyttende. Plasmanivåer for ET-743 hos rotter som mottok dex (50 mg/kg) daglig i 3 dager før ET-743, minsket ikke sammenlignet med dem hos rotter som ble holdt på ET-
25 743 alene. Dessuten ble aktiviteten til ET-743 overfor B16-melanom implantert hos mus, ikke hemmet av dexametason. Disse resultater indikerer at tilsetningen av høydosedexametason til ET-743-regimet kan forbedre dets hepatotoksisitet hos kreftpasienter.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av ET-743 ved fremstilling av et medikament
5 for effektiv behandling av en tumor i kombinasjonsterapi under
anvendelse av ET-743 i synergistisk kombinasjon med et annet
antitumorlegemiddel valgt fra cisplatin, paclitaxel, gemcitabin,
7-etyl-10-hydroksycamptotecin (SN-38), trimetrexat, doxorubicin
og vinblastin.
- 10 2. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
anvender ET-743 og doxorubicin.
3. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
15 anvender ET-743 og cisplatin.
4. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
anvender ET-743 og paclitaxel.
- 20 5. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
anvender ET-743 og gemcitabin.
6. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
anvender ET-743 og SN-38.
- 25 7. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
anvender ET-743 og trimetrexat.
8. Anvendelse ifølge krav 1, hvori kombinasjonsterapien
30 anvender ET-743 og vinblastin.
9. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 2, 3, 4
eller 7 for behandling av sarkom.
- 35 10. Anvendelse ifølge krav 3 eller 6 for behandling av
tykktarmskreft.
11. Anvendelse ifølge krav 3 for behandling av intestinent
karsinom.

12. Anvendelse ifølge krav 3 eller 6 for behandling av lungekreft.
- 5 13. Anvendelse ifølge krav 5 for behandling av brystkreft.
14. Anvendelse ifølge krav 8 for behandling av nyrekreft.
15. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående
10 krav, hvori ET-743 og det andre antitumorlegemiddel tilveiebringes som et enkelt medikament.
16. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til
14, hvori ET-743 og det andre antitumorlegemiddel tilveiebringes
15 som separate medikamenter.
17. Anvendelse ifølge krav 16, hvori det separate medika-
ment inneholdende ET-743, er for administrering på samme tid som
medikamentet inneholdende det andre antitumorlegemiddel.
20
18. Anvendelse ifølge krav 16, hvori det separate medika-
ment inneholdende ET-743, er for administrering til en annen tid
enn medikamentet inneholdende det andre antitumorlegemiddel.
- 25 19. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående
krav, hvori det andre antitumorlegemiddel eller kombinasjonen
avgis ved liposom- eller nanokuleinnkapsling.
20. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående
30 krav, hvori kombinasjonsterapien ytterligere anvender dexa-
metason.
21. Synergistisk kombinasjon,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter ET-743 og
35 et annet antitumorlegemiddel valgt fra cisplatin, paclitaxel,
gemcitabin, 7-etyl-10-hydroksycamptotecin (SN-38), trimetrexat,
doxorubicin og vinblastin for anvendelse ved behandling av kreft.