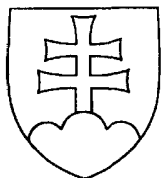


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287901

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2012.01):

A61K 31/00

A61K 33/00

A61K 45/00

A61P 35/00

A61P 43/00

- (21) Číslo prihlášky: **549-2003**
(22) Dátum podania prihlášky: **6. 11. 2001**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **2. 3. 2012**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2012**
(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**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **20. 2. 2012**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/GB01/04902**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/36135**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

- (73) Majiteľ: **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 účinnú protinádorovú liečbu**

- (57) Anotácia:
Ecteinascidín 743 použitý na prípravu lieku na účinnú liečbu nádoru založenú na kombinovanej terapii využívajúcej Ecteinascidín 743 s ďalšími prídavnými liečivami.

SK 287901 B6

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa vzťahuje na účinnú protinádorovú liečbu. Ecteinascidín 743, ET-743, je látka s protinádorovým účinkom získaná z morského zdroja.

5

Doterajší stav techniky

Na získanie informácií o zložení ET-743 a jeho použití v protinádorovej liečbe odkazujeme na patent č. WO 0069441, publikovaný 23. novembra 2000.

10

Podstata vynálezu

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

15

a) liečivá s antimitotickým účinkom, najmä tie, ktoré sú cieleňé proti zložkám cytoskeletu vrátane mikrotubulárnych modulátorov, ako sú taxány (napr. taxol, paclitaxel, taxoter, docetaxel), podofylotoxíny alebo vincaalkaloidy (vincristín, vinblastín);

20

b) antimetabolity, ako je 5-fluórouracil, cytarabín, gemcitabín, analógy purínov (napr. pentostatín, metotrexát);

c) alkylačné činidlá ako analógy horčičného dusíka (napr. cyklofosfamid alebo ifosfamid);

25

d) liečivá cieleňé proti DNA, ako sú antracyklíny adriamycín, doxorubicín, farmorubicín alebo epirubicín;

e) liečivá namierené proti topoizomerázam ako etopozid;

f) hormóny a agonisty alebo antagonisty hormónov, ako sú estrogény, antiestrogény (tamoxifén a od neho odvodené zlúčeniny) a androgény, flutamid, leuprorelín, goserelín, cyprotrón alebo octreotid;

g) liečivá zasahujúce do prenosu signálu v nádorovej bunke vrátane tých, odvodených od protilátok, napr. herceptín;

30

h) alkylačné látky, ako sú platínové preparáty (cisplatina, karbonplatina, oxaliplatina, paraplatina) alebo deriváty nitrosurey;

i) liečivá potenciálne ovplyvňujúce metastázovanie nádorov, ako sú inhibítory matrixovej metaloproteinázy;

35

j) génová terapia a tíšiacе prostriedky/alternatívne (antisense) liečivá;

k) protilátky využívané v protinádorovej terapii;

l) ďalšie bioaktívne zlúčeniny morského pôvodu, najmä didemniny, ako je aplidín;

m) analógy steroidov, najmä dexametazón;

n) protizápalové lieky, najmä dexametazón;

40

o) antiemetiká, 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 atymických myší.

45

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

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

50

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

Príklad 4 poskytuje vyhodnotenie účinnosti v závislosti od poradia aplikácie pri kombinácii ET-743 s chemoterapeutikami proti skupine ľudských nádorových bunkových línii, najmä kombinácií ET-743 s doxorubicínom, taxolom, 7-etyl-10-hydroxykamptotecínom (SN-38), cisplatinou a gemcitabínom.

55

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

60

bunkám hrubého čreva, pľúcny, prsníka, kostného sarkómu), v niektorých príkladoch bol účinok na nádor závislý od poradia expozície nádoru jednotlivým chemoterapeutikám. Tiež v tomto prípade výsledky ponúkajú nádej na liečbu pacientov.

5 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).

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

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

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

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

20 Predkladaný vynález môže byť využitý na liečbu akéhokoľvek cicavca, najmä človeka, ktorý je postihnutý nádorovým ochorením, pričom liečenie zahŕňa podanie terapeuticky účinného množstva vynálezom opísanej zlúčeniny alebo z nej vytvoreného farmaceutického prípravku postihnutému jedincovi.

Predkladaný vynález sa tiež vzťahuje na farmaceutické prípravky zahrnujúce farmaceuticky akceptovateľný nosič, ktorý ako aktívnu zložku obsahuje vynálezom opísanú zlúčeninu.

25 Príklady farmaceutických prípravkov zahrnujú akúkoľvek pevnú (tablety, pilulky, kapsuly, granuly atď.) alebo kvapalnú (roztoky, suspenzie alebo emulzie) formu so zodpovedajúcim zložením umožňujúcu perorálnu, lokálnu alebo parenterálnu aplikáciu, keď tento prípravok môže obsahovať čistú zlúčeninu alebo akúkoľvek nosič alebo iné farmaceuticky aktívne zlúčeniny. Na parenterálnu aplikáciu je nutné, aby tieto prípravky boli sterilné.

30 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 môže 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 nanosférickej enkapsulácie, môžu byť v podobe dlhodobu sa uvoľňujúcich prípravkov alebo dopravované do organizmu formou iných štandardných prostriedkov.

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

40 Kombinácie opisované týmto vynálezom môžu byť použité u refrakterných pacientov (nedopovedajúcich 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.

45

Príklady uskutočnenia vynálezu

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

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

55 Vzhľadom na potenciálny klinický význam kombinovania ET-743 s Dx sme testovali túto kombináciu pri myšom fibrosarkóme UV2237, pri jeho mdr-rezistentnom subtype UV2237/ADR a pri xenografe ľudského rabdomyosarkómu TE671. ET-743 aj Dx boli každý izolovane účinný pri bunkovej línii myšieho fibrosarkómu UV2237, zatiaľ čo ani jeden nebol alebo bol len obmedzene účinný proti línii 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 od poradia aplikácie liečiv alebo od kombinácie.

Po jednorazovom i. v. zaličení uskutočnenom vo fáze, keď masa tumor TE671 dosahovala približne 100 mg, došlo k hmotnostnej regresii tumoru (TWI) a logaritmickej poklesu počtu buniek (\log_{10} cell kill - LCK), respektive, 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 spôsobia synergický cytotoxický účinok pri bunkových líniiach sarkómov mäkkých tkanív HT-1080 a HS-18.

Pri dvoch bunkových líniiach 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 pri kombinácii ET-743-doxorubicín, tento účinok sa však neobjavil pri kombinácii 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 obojm bunkovým líniiam tiež získaný pri kombinácii 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 cisplatinu

Pri Ecteinascidíne 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 reparovného 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 zaistujúcich (nádorovej bunke) opravu defektov spôsobených ET-743 a cisplatinou a vzhľadom na potenciálny klinický záujem o túto kombináciu, vykonali sme štúdiu hodnotiacu cytotoxické účinky ET-743 a cisplatinu na niekoľkých ľudských nádorových líniiach. V tejto štúdiu bola použitá bunková línia karcinómu ovaria Igrove-1, jej subtyp rezistentný na ET-743 (IG/PSC/ET) a bunková línia karcinómu hrubého čreva HCT 116 (MMR-deficientný) a HCT11-ch3 (s normálnou funkciou MMR).

Bunky boli exponované počas 1 alebo 24 hodín rôznym koncentráciám samostatne aplikovaného ET-743 alebo DDP alebo ich kombináciám a cytotoxický účinok bol po odfarbení sulforotamínom B hodnotený pomocou kalorimetrickej kvantifikácie. Pri všetkých bunkových líniiach bol v oboch prípadoch jednodinovej aj 24-hodinovej inkubácie pozorovaný synergický účinok. Zaujímavé bolo zistenie, že pri HCT116 rezistentného k DDP zrejme ET-743 umožnilo spätné dosiahnutie senzitivity, a to aj v koncentráciách, 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 bunkových línii. 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 bunkovým líniiam nemalobunkového karcinómu pľúc (predchádzala expozícia SN-38), osteosarkómu (preexpozícia s ET-743, následne cisplatinou), 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 pri bunkovej línii nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCL); preexpozícia s SN-38 pri karcinóme čreva a NSCL; súčasná expozícia ET-743 a cisplatine pri osteosarkóme a ET-743 a

SN-38 pri NSCL). Antagonizmus bol preukázaný pri súčasnom použití ET-743 s taxolom pri dvoch NSCL líniách a s doxorubicínom pri rabdomyosarkómovej línii.

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

Bunková kultúra:

Nádorové bunkové línie ľudského karcinómu prsníka (MDA-435, MDA-231, T-470), nemalobunkového 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 počas 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 počas 3 dní s následným pridaním MTT na čas 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 na priemernú hodnotu 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 neskôr:

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 absorbancie 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 definovanou hranicou alebo pod definovanou hranicou, potom opisujeme antagonizmus, respektíve synergizmus. Iné rozloženie nameraných hodnôt zodpovedá skôr aditívnemu účinku pri vzájomnej interakcii. Veľmi ťažká 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/bunková 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

SK 287901 B6

Postupné kombinácie ET-743 s chemoterapeutikami		
Typ tumoru/bunková línia	Podmienky expozície/liečivo	Zistená vzájomná interakcia
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
Sa06	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
Nemalobunkový karcinóm pľúc		
NCB-H226	24 hodín ET-743, následne 24 hodín taxol;	Aditívny účinok
	24 hodín taxol, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a taxol;	Antagonizmus
	24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38;	Aditívny účinok/Synergizmus
	24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok/Synergizmus
	24 hodín súčasne ET-743 a SN38	Aditívny účinok
NCB-N522	24 hodín ET-743, následne 24 hodín taxol;	Aditívny účinok
	24 hodín taxol, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a taxol;	Antagonizmus
	24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38;	Aditívny účinok/Synergizmus
	24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok/Synergizmus
	24 hodín súčasne ET-743 a SN38	Aditívny účinok
NCB-N23	24 hodín ET-743, následne 24 hodín taxol;	Aditívny účinok/Antagonizmus
	24 hodín taxol, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a taxol;	Antagonizmus
	24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38;	Aditívny účinok
	24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743;	Synergizmus
	24 hodín súčasne ET-743 a SN38	Aditívny účinok/Synergizmus
Karcinóm prsníka		
MDA-435	24 hodín ET-743, následne 24 hodín gemcitabín;	Aditívny účinok
	24 hodín gemcitabín, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a gemcitabín	Aditívny účinok
MDA-231	24 hodín ET-743, následne 24 hodín gemcitabín;	Aditívny účinok
	24 hodín gemcitabín, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a gemcitabín	Aditívny účinok

Postupné kombinácie ET-743 s chemoterapeutikami		
Typ tumoru/bunková línia	Podmienky expozície/liečivo	Zistená vzájomná interakcia
T47-8	24 hodín ET-743, následne 24 hodín gemcitabín;	Aditívny účinok
	24 hodín gemcitabín, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a gemcitabín	Aditívny účinok
Karcinóm hrubého čreva		
MCT-116	24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38;	Synergizmus
	24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a SN38	Aditívny účinok
NT-29	24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38;	Aditívny účinok
	24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a SN38	Aditívny účinok
Colo-320	24 hodín ET-743, následne 24 hodín SN38;	Aditívny účinok
	24 hodín SN38, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok/Synergizmus
	24 hodín súčasne ET-743 a SN38	Synergizmus
Rabdomyosarkóm		
RN1	24 hodín ET-743, následne 24 hodín doxorubicín;	Aditívny účinok
	24 hodín doxorubicín, následne 24 hodín ET-743	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a doxorubicín	Aditívny účinok
RD	24 hodín ET-743, následne 24 hodín doxorubicín;	Aditívny účinok
	24 hodín doxorubicín, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a doxorubicín	Aditívny účinok/Antagonizmus
RN30	24 hodín ET-743, následne 24 hodín doxorubicín;	Aditívny účinok
	24 hodín doxorubicín, následne 24 hodín ET-743;	Aditívny účinok
	24 hodín súčasne ET-743 a doxorubicín	Antagonizmus

Záver

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

- 5 Preukázateľný synergický účinok bol pozorovaný pri preexpozícii SN-38 pri NSCL bunkovým líniam NC1-H522 a NC1-H23, preexpozície ET-743 pri jeho kombinácii s cisplatinou pri HOS osteosarkóme, s gemcitabínom pri línii karcinómu prsníka T-470, preexpozície SN-38 pri karcinóme hrubého čreva HCT-116 a súčasná expozícia ET-743 a SN-38 pri línii karcinómu hrubého čreva Colo-320. Antagonizmus bol preukázaný pri súčasnom použití ET-743 s taxolom pri NSCL línii NC1-H522 a NC1-H23 a s doxorubicínom pri 10 RHI rabdomyosarkómovej línii.

Príklad 5: Interakcie medzi ET-743 a inými látkami používanými na liečbu nádorov

- 15 Aj keď je ET-743 v súčasnosti v štádiu klinických štúdií na liečbu nádorov u ľudí, mechanizmus jeho protinádorového účinku nebol dosiaľ 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 pri dvoch líniah sarkómov mäkkých tkanív, HT-1080 a HS-18. DXR jediný v kombinácii s ET-743 dosahoval synergie nezávislej od poradia aplikácie. Súčasná aplikácia ET-743 s DXR viedla k synergickému účinku pri oboch bunkových líniah.

- 5 CI (priemerné) na dané dávkovacie schéma 0,86, 0,83, 0,84 a 0,85 pri 50 %, 75 %, 90 % a 95 % zániku buniek, respektíve, pri HT-1080 línii a 0,89, 0,74, 0,64 a 0,60 pri 50 %, 75 %, 90 % a 95 % zániku buniek, respektíve pri HS-18 línii. Poradie, keď 24 hodínová inkubácia s ET-743 predchádzala aplikácii doxorubicínu, sa ukázalo ako najúčinnnejší postup pri oboch bunkových líniah; výsledkom bol sústavne nízky CI zodpovedajúci až 90 % hodnote zániku nádorových buniek pri oboch líniah. 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

- 15 Použité 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).

Bunková kultúra

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

SRB kvantifikácia cytotoxicity

- 25 Cytotoxicita aktívnych látok bola určená pomocou SRB kvantifikácie cytotoxicity vykonanej v 96-jamkových mikrotitračných doštičkách podľa opísaného postupu. Bunky boli umiestnené do jamiek v duplikáte (5000 buniek/jamka) a vystavené účinku liečiv s rôznymi koncentraciami. Bunky boli fixované 50 % roztokom TCA počas 1 hodiny a do každej jamky bolo pridané 0,4 % SRB (sigma). Po 30-minútovej inkubácii boli doštičky premyté 1 % kyselinou octovou a odcítané pri 570 nm na odcítavacom 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

- 35 Bunky boli umiestnené do 96-jamkových doštičiek, ako je opísané. Kultúry boli ošetrené siedmimi rôznymi koncentraciami 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

- 40 S použitím rovnakého experimentálneho systému opísaného skôr, 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 čas 48 hodín pridaný druhý typ liečiva do príslušnej jamky.

Analýza zastúpených fáz bunkového cyklu

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

- 50 Určenie synergizmu a antagonizmu a konštrukcie izobologramu

CI bol vypočítaný pomocou Chou-Talalayovej rovnice, ktorá započítava tak potenciú (D_m alebo IC₅₀), ako aj tvar krivky závislosti účinku od dávky (hodnota m). Všeobecná rovnica pre klasický izobologram (CI= 1) je daná vzťahom:

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

- 55 kde (Dx)₁ + (Dx)₂ v menovateľoch sú dávky (alebo koncentrácie) pre samotné D₁ (ET-743) a D₂ (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 zodpovedajúca strednému účinku získaná z anti-log X-vymedzení oblasti stredného účinku, X-log (D) verzus Y - log[fa / (1 - fa)] alebo

5 Dm = $10^{-(Y - \text{vymedzenie})/m}$, kde m je sklon oblasti stredného účinku. Softvér 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:

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

10 Tento tretí výraz sa obvykle pre zjednodušenie vypúšťa a je potom indikované vzájomné výnimočné pre-vzatie 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

15

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

Účinok každého z chemoterapeutík na distribúciu fáz bunkového cyklu u bunkovej 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

Účinok každého z chemoterapeutík na distribúciu fáz bunkového cyklu u bunkovej 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

20

Výsledok 2 ukazuje CI per bunkové 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 pri obidvoch bunkových líniách. CI (priemerné) s touto dávkova-
 25 cou schémou boli 0,86, 0,83, 0,84 a 0,85 pri 50 %, 75 %, 90 % a 95 % zániku buniek, respektíve, pri HT-1080 línií a 0,89, 0,74, 0,64 a 0,60 pri 50 %, 75 %, 90 % a 95 % zániku buniek, respektíve, pri HS-18 línií. Tento výsledok ukázal, že súčasná expozícia ET-743 a DXR vytvára synergický cytotoxický účinok. Naopak,

v prípade súčasnej expozície buniek kombinácií ET-743 s TMTX alebo s paclitaxelom bol pozorovaný antagonisticý cytotoxický účinok.

CI hodnota bola získaná pri oboch bunkových líniiach, ktoré boli počiatočne ošetrované ET-743 počas 24 hodín, s následnou expozíciou DXR počas 48 hodín. Pri oboch bunkových líniiach 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 pri oboch líniiach.

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 pri oboch bunkových líniiach, 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 malígnej fibrosarkómovej línii HT-1080.

DXR v kombinácii s ET-743 vytvára synergický účinok nezávislý od poradia expozície, ale expozícia ET-743 nasledovaná DXR sa zdá ako účinnejšia pri oboch bunkových líniiach.

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

Príklad 6: Kombinácia chemoterapeutík s ecteinascidínom 743 (ET-743) použitá *in vivo* pri solídnych nádoroch

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 aktivity jadrového receptora SXR (Synold et al., Nature Med 7, 584, 2001). Samostatne, ET-743 inhibuje *in vivo* nádorový rast s dosiahnutím kompletnej remisie pri niekoľkých ľudských nádorových líniiach/kmeňoch (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 pri rezistentných nádoroch alebo relapsoch.

Na zhodnotenie významu účinku týchto kombinácií bolo niekoľko účinných látok zahrnujúcich doxorubicín (DXR; 8 mg/kg), cisplatinu (DDP; 12 mg/kg) a vinblastín (VINB; 6 mg/kg) podaných pred/po ET-743 (0,2 mg/kg), keď predchádzalo ošetrovanie buniek gdx5 1 hodinu pred expozíciou, pri týchto nádoroch: 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. Pri dutovláknovom modeli (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 pri 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 pri osteosarkóme (39 % T/C). Dáta získané pri xenografe 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). Pri ľadvinových xenografach 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 pri xenografach nádorov prsníka, ľadviny, žalúdka a melanómu.

Príklad 7: Predklinická aktivita a biodistribúcia kombinácií ecteinascidínu 743 (ET-743) s doxorubicínom (DXR) pri ľudskom rhabdomyosarkóme

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 na potenciál ET-743 ako účinného liečiva, sme skúmali (I) predklinickú protinádorovú aktivitu kombinácie ET-

-743/DXR pri ľudskom rabdomyosarkóme a (2) možné vzájomné interakcie liečiv a ich biodistribúciu na 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 pri bunkovej línii TE 671. Kombinácia, v súlade s izobologramom a kombinačným indexom, mali pri najmenšom aditívny účinok pri niekoľkých nádorových líniiach vrátane TE 671.

In vivo: Bolusové i. v. dávky (ET-743, 0,1 mg/kg; DXR, 10 mg/kg) boli podané holej myši v okamihu, keď tumor dosahoval približne 100 mg. Hodnoty poklesu hmotnosti tumoru/ \log_{10} počtu zaniknutých buniek boli 46 %/0,132 pri samostatnej aplikácii ET-743, 50 %/0,33 pri samostatnej aplikácii DXR, 77 %/0,924 pri súčasnej aplikácii 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 pri myšom fibrosarkóme UV2237 a pri jeho multirezistentnom subtype UV2237/ADR.

Tieto dáta ukazujú synergický účinok ET-743/DXR a tento účinok sa zdá byť v ďalšom vývoji nezávislý od poradia aplikácie liečiv aj od kombinácie. 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*, ale synergicky *in vivo* pri rabdomyosarkóme TE 671. FK profil DXR nie je ovplyvnený súčasným podaním ET-743. Tieto dáta poskytujú dôvod na vykonanie iníciaľných klinických skúšok na použitie tejto kombinácie.

Príklad 8: ET-743 a cisplatina (DDP) vykazujú *in vitro* a *in vivo* synergický účinok pri bunkových líniiach 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 línii zahrnujúcich ľudský karcinóm čreva (HCT116), karcinóm ovaria (Igrov-1, A2780), ich rezistentné subtypy (Igrov-1/PSC-ET a 1A9, rešpektíve) a rabdomyosarkóm (TE671) by nižšie koncentrácie samostatne aplikovaného ET-743 mohli až dvojnásobne zvýšiť účinok DDP. Koncentrácie zodpovedajúce IC30/IC50 pre ET-743 vedú k doplnkovému alebo synergickému účinku. Tieto výsledky vyústili v *in vivo* štúdiu s použitím xenograftových modelov s cieľom skúmať účinné kombinácie liečiv s ET-743.

Pri 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. Pri ovariálnom tumore, ktorý je za normálnych podmienok rezistentný k ET-743 aj DDP pri izolovanom použití, vytvorila ich kombinácia rastovú inhibíciu tumoru väčšiu než 50 %. Pri ortotopicky transplantovanom ľudskom ovariálnom karcinóme 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 pri sarkómoch a karcinómoch ovaria. *In vitro* a *in vivo* štúdie prebiehajú s cieľom objasniť mechanizmy synergického účinku medzi ET-743 a DDP pri týchto typoch nádorov.

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

ET-743, látka získaná z morského tunikátu, je v súčasnosti v štádiu II. fázy klinických skúšok. Vykazuje klinickú aktivitu proti sarkómu 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 krýs, ktorá je zo zvierat najviac citlivá, je toxicita charakterizovaná pečeneovou nekrózou a zápalom žlčovodu. Na základe protizápalového účinku dex, sme skúsili jeho vplyv na pečeneové poškodenie u krýs vyvolané ET-743. Samiciam krýs kmeňa Wistar bola i. v. aplikovaná jedna dávka ET-743 (40 μ g/kg). Niektoré krýsy pred aplikáciou ET-743 jednu p. o. dávku dex, 1, 5, 10 alebo 20 mg/kg za 24 hodín. Pečeneové 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 pečeneového tkaniva boli hodnotené na svetelnom mikroskope.

Dva dni po liečbe ET-743 prejavovalo pečeneové tkanivo krýs, ktoré dostali samotný ET-743, známky zápalu žlčovodov, výrazne degeneratívne zmeny epitelu žlčovodov a boli zjavné okrsky nekrózy pečeneového 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 protektívny len málo, dávka 5 mg/kg mala už miernu protektivitu. Plazmatické hladiny ET-743 u krýs, ktoré dostali každý deň dex (50 mg/kg) počas troch dní pred aplikáciou ET-743, neboli znížené v porovnaní s krýsami 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 synergetickej kombinácie Ecteinascidínu 743 a prídavného liečiva vybraného zo skupiny zahrnujúcej antracyklín, platínu, liečivo zamerané na topoizomerázu, taxán, antimetabolit alebo antimitotické liečivo na výrobu lieku na liečbu nádoru.

2. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a doxorubicín.

3. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a cisplatinu.

4. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a paklitaxel.

5. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a gemcitabín.

6. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a 7-etyl-10-hydroxykaptotecín.

7. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a trimetrexát.

8. Použitie podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia využíva Ecteinascidín 743 a vinblastín.

9. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 2,3,4 alebo 7 na liečbu sarkómu.

10. Použitie podľa nároku 3 alebo 6 na liečbu rakoviny hrubého čreva.

11. Použitie podľa nároku 3 na liečbu intestinálneho nádoru.

12. Použitie podľa nároku 3 alebo 6 na liečbu pľúcnej rakoviny.

13. Použitie podľa nároku 5 na liečbu rakoviny prsníka.

14. Použitie podľa nároku 8 na liečbu rakoviny obličiek.

15. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že Ecteinascidín 743 a prídavné liečivo sú poskytnuté ako jeden liek.

16. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že Ecteinascidín 743 a prídavné liečivo sú poskytnuté ako separátne lieky.

17. Použitie podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že separátny liek obsahujúci Ecteinascidín 743 je podávaný v tom istom čase ako liek obsahujúci prídavné liečivo.

18. Použitie podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že separátny liek obsahujúci Ecteinascidín 743 je podávaný v rozdielnom čase ako liek obsahujúci prídavné liečivo.

19. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že prídavné liečivo alebo kombinácia je dopravená v lipozómoch alebo pomocou nanosferickej enkapsulácie.

20. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c e s a t ý m**, že kombinačná terapia ďalej využíva dexametazón.

21. Synergetická kombinácia Ecteinascidínu 743 a prídavného liečiva vybraného zo skupiny zahrnujúcej antracyklín, platínu, liečivo zamerané na topoizomerázu, taxán, antimetabolit alebo antimitotické liečivo na použitie na liečbu nádoru, ako je opísaný v akomkoľvek z predchádzajúcich nárokov.

Koniec dokumentu