

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1327

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.11.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.11.2000 13.11.2000
19.10.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/246233 2000/248095
2001/345982**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003
(Věstník č. 11/2003)**

(86) PCT číslo: **PCT/GB01/04902**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/036135**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 35/00

A 61 K 45/06

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

PHARMA MAR, S. A., Madrid, ES;

(72) Původce:

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) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Užití ET-743 k výrobě léků pro účinnou
protinádorovou léčbu**

(57) Anotace:

ET-743 je použito v přípravě léku pro účinnou léčbu nádoru,
založenou na kombinované terapii, využívající ET-743
s dalšími léčivy.

UŽITÍ ET-743 K VÝROBĚ LÉKU PRO ÚČINNOU PROTINÁDOROVOU LÉČBU

Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje k účinné protinádorové léčbě.

Ecteinascidin 743, ET-743, je látka s protinádorovým účinkem získaná z mořského zdroje.

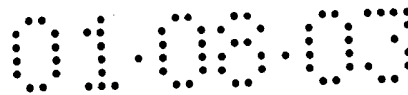
K získání informací o složení ET-743 a jeho užití v protinádorové léčbě odkazujeme na patent č. WO0069441, publikovaný 23. listopadu 2000.

Podstata vynálezu

V rámci jednoho aspektu tohoto vynálezu nabízíme účinné kombinované léčebné postupy založené na Ecteinascidinu 743 s využitím dalších léčiv.

Další užitá léčiva mohou být součástí jednoho přípravku nebo se mohou vyskytovat ve formě jednotlivých přípravků určených k podání najednou nebo v různém čase. Okruh těchto dalších léčiv není nijak specificky omezen, mezi vhodné kandidáty lze zařadit:

- a) léčiva s antimitotickým účinkem, zejména ta, která jsou cílená proti složkám cytoskeletu, včetně mikrotubulárních modulátorů jako jsou taxany (např. taxol, paclitaxel, taxotere, docetaxel), podofylotoxiny nebo vincaalkaloidy (vincristin, vinblastin);
- b) antimetabolity jako je 5-fluorouracil, cytarabin, gemcitabin, analogy purinů (např. pentostatin, metotrexat);
- c) alkylační činidla jako analogy hořčičného dusíku (např. cyklofosfamid nebo ifosfamid);
- d) léčiva cílená proti DNA jako jsou antracykliny adriamycin, doxorubicin, farmorubicin nebo epirubicin;
- e) léčiva namířená proti topoizomerázám jako etoposid;
- f) hormony a agonisté nebo antagonisté hormonů jako jsou estrogeny, antiestrogeny (tamoxifen a od něj odvozené sloučeniny) a androgeny, flutamid, lueprorelin, goserelin, cyprotron nebo octreotid;
- g) léčiva zasahující do přenosu signálu v nádorové buňce včetně těch, odvozených od protilátek, např. herceptin;
- h) alkylační látky jako jsou platinové preparáty (cisplatina, karbonplatina, oxaliplatina, paraplantina) nebo deriváty nitrosurey;



- i) léčiva potenciálně ovlivňující metastazování nádoru jako jsou inhibitory matrixové metaloproteiny;
- j) genová terapie a tišící prostředky/alternativní (antisense) léčiva;
- k) protilátky využívané v protinádorové terapii;
- l) další bioaktivní sloučeniny mořského původu, zejména didemniny jako je aplidin;
- m) analogy steroidů, zejména dexametason;
- n) protizánětlivé léky, zejména dexametason;
- o) antiemetika, zejména dexametason.

V rámci podrobného popisu tohoto patentu uvádíme několik příkladů, na které na tomto místě odkazujeme. Tyto příklady ukazují zvýšenou účinnost ET-743 v případě jeho užití v kombinaci s dalšími léčivy a zabývají se různými kombinacemi užívajícími ET-743.

Příklad 1 popisuje účinné kombinace ET-743 a doxorubicinu inhibující nádorový růst myších a lidských sarkomů u athymických myší.

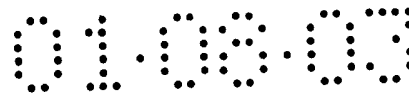
Příklad 2 ukazuje synergický cytotoxický účinek ecteinascidinu 743 (ET-743) a doxorubicinu na sarkomy měkkých tkání u linií HT-1080 a HS-18.

Tyto dva příklady ukazují, že u kombinace ET-743 s antracykliny (zejména doxorubicinem) se jedná o více než pouhý aditivní účinek, kdy tato kombinace je proti lidským nádorům (v těchto příkladech sarkomům) účinnější než izolované užití zmíněných léčiv a její účinek nezávisí na pořadí podání léčiv. Tyto výsledky nabízí jasnou naději pro léčbu pacientů.

Příklad 3 ukazuje synergický cytotoxický účinek ET-743 s cisplatinou.

Příklad 4 poskytuje vyhodnocení účinnosti v závislosti na pořadí aplikace u kombinací ET-743 s chemoterapeutiky proti skupině lidských nádorových buněčných linií, zejména kombinací ET-743 s doxorubicinem, taxolem, SN-38, cisplatinou a gemcitabinem.

Tyto dva příklady ukazují, že účinek kombinací ET-743 s platinovými protinádorovými preparáty (zejména s cisplatinou), nukleosidovým analogem gemcitabinem a inhibitorem topoizomerázy II (SN-38, což je účinná látka vyráběná z CPT-11, léčiva camptothecinové skupiny) je větší než pouze aditivní. Účinek těchto kombinací proti lidským nádorům je tedy opět vyšší než účinek při samostatném použití léčiv (v těchto konkrétních příkladech byly uvedené kombinace použity proti různým nádorovým buňkám: ovariálním, buňkám tlustého střeva, plicním, prsu, kostního sarkomu), v některých případech byl účinek na nádor závislý na pořadí expozice nádoru jednotlivým chemoterapeutikům. Také v tomto případě nabízí výsledky naději pro léčbu pacientů.



Bylo zajímavé, že synergismus nebylo možné předem předvídat: příklad 4 ukazuje, že ve většině testovaných kombinací nebyl pozorován synergismus žádný (v některých byl dokonce zaznamenán antagonismus účinku chemoterapeutik).

Příklad 5 se vztahuje k hodnocení kombinace ET-743 s doxorubicinem nebo trimetrexatem nebo paclitaxalem. Ukazuje větší než pouze aditivní účinek kombinace ET-743 s antracykliny (zejména doxorubicinem), který je při užití proti lidským nádorům (zde konkrétně proti sarkomům) vyšší než samostatný účinek jakéhokoliv z chemoterapeutik a je nezávislý na pořadí aplikace léčiv. Takové závěry nabízí naději pro léčbu pacientů.

Příklady 6 až 8 podporují a doplňují předchozí příklady a ukazují zejména synergii ET-743 s doxorubicinem a ET-743 s cisplatinou.

Příklad 9 představuje odlišných typ účinnosti kombinací popisovaných tímto vynálezem a to použití vysokých dávek dexametasonu chránících před hepatotoxicitou ecteinascidinu-743 (ET-743).

Ve shrnutí, tento vynález nabízí přípravky, způsoby léčby, postupy výroby zmíněných přípravků a konkrétní realizaci přípravků.

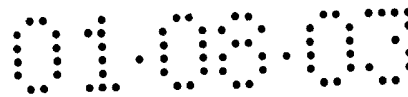
Předkládaný vynález se vztahuje také na použití vynálezem popisovaných sloučenin v léčebném postupu a na použití sloučenin ve výrobě přípravků pro léčbu rakoviny.

Předkládaný vynález tedy nabízí způsob léčby zhoubného nádorového onemocnění vyskytujícího se u jakéhokoliv savce, zejména člověka, kdy tento způsob zahrnuje podání terapeuticky účinného množství vynálezem popsané sloučeniny nebo více sloučenin nebo z ní vytvořeného farmaceutického přípravku postiženému jedinci.

Předkládaný vynález se také vztahuje k farmaceutickým přípravkům zahrnujícím farmaceuticky akceptovatelný nosič, který jako aktivní složku obsahuje vynálezem popsanou sloučeninu nebo sloučeniny, a zároveň se vynález vztahuje k postupům výroby těchto přípravků.

Příklady farmaceutických přípravků zahrnují jakoukoliv pevnou (tablety, pilulky, kapsle, granule, atd.) nebo kapalnou (roztoky, suspenze nebo emulze) formu o odpovídajícím složení umožňující perorální, lokální nebo parenterální aplikaci, kdy tento přípravek může obsahovat čistou sloučeninu nebo příměs jakéhokoliv nosiče nebo jiných farmaceuticky aktivních sloučenin. Pro parenterální aplikaci je nutné, aby tyto přípravky byly sterilní.

Sloučeniny nebo přípravky popisované předkládaným vynálezem je možné aplikovat jakýmkoliv vhodným způsobem jako je intravenózní infuze, perorální, intraperitoneální nebo intravenózní podání. My upřednostňujeme infúzní podání s délkou trvání infuze do 24 hodin, lépe však v rozmezí 2 až 12 hodin, optimálně v rozmezí 2 až 6 hodin. Nejvhodnější jsou krátkodobé infuze umožňující léčbu bez nutnosti hospitalizace pacienta přes noc. Pokud to však



situace vyžaduje může délka infúzní terapie dosahovat 12 až 24 hodin nebo být i delší. Infuze mohou být aplikovány ve vhodných intervalech asi 2 až 4 týdnů. Farmaceutické přípravky obsahující sloučeniny popisované předkládaným vynálezem mohou být do místa účinku dopravovány v liposomech nebo pomocí nanosferické enkapsulace, mohou být v podobě dlouhodobě se uvolňujících přípravků nebo dopravovány do organismu formou jiným standardním prostředků.

Správná dávka sloučenin se bude lišit v závislosti na konkrétním složení přípravku, jeho způsobu podání a konkrétním stavu léčeného pacienta a stadiu nádorového onemocnění. Je nutné zvážit další faktory jako je věk nemocného, váha, pohlaví, dobu podání, rychlost exkrece, kombinace užitých léčiv, citlivost odpovědi a závažnost onemocnění. Podávání může být kontinuální nebo opakované splňující limit maximální tolerované dávky (MTD).

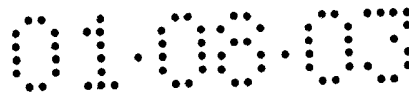
Kombinace popisované tímto vynálezem mohou být použity u refrakterních pacientů (neodpovídajících na jiný způsob léčby). Pro informace o dávkovacích schématech ET-743 a dalším užití v kombinované terapii popisované tímto vynálezem, odkazujeme čtenáře na patent č. WO 006 944 1.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Účinné kombinace ET-743 a doxorubicinu inhibující nádorový růst u myších a lidských sarkomů atymických myši

Potvrdili jsme klinickou aktivitu ET-743 u pacientů se sarkomem měkkých tkání nebo kosti neodpovídajícím na dosavadní chemoterapii včetně doxorubicinu (DXR) a izosfamidů. Vzhledem k potenciálnímu klinickému významu kombinování ET-743 s Dx jsme testovali tuto kombinaci u myšího fibrosarkomu UV2237, u jeho mdv-rezistentního subtypu UV2237/ADR a u xenograftu lidského rhabdomyosarkomu TE671. ET-743 i Dx byly každý izolovaně účinný u buněčné linie myšího fibrosarkomu UV2237, zatímco ani jeden nebyl nebo byl pouze omezeně účinný proti liniím UV2237/ADR a TE671. Naproti tomu, kombinace ET-743 s Dx byla účinná v případě všech tří modelů. Synergismus byl zvláště významný proti lidskému rhabdomyosarkomu TE671 a zdálo se, že není závislý na pořadí aplikace léčiv nebo na kombinaci.

Po jednorázovém i.v. zaléčení uskutečněném ve fázi, kdy masa tumor TE671 dosahovala přibližně 100 mg, došlo k hmotnostní regresi tumoru (TWI) a logaritmičkému poklesu počtu buněk (\log_{10} cell kill – LCK), respektive, o 46 % a 0,132 po samotné aplikaci ET-743 (0,1



mg/kg), o 50 % a 0,33 po samostatné aplikaci Dx (10 mg/kg), o 77 % a 0,924 po současné aplikaci ET-743 (0,1 mg/kg) a Dx (10 mg/kg), o 82 % a 1,12 po kombinované aplikaci ET-743 (0,1 mg/kg) 1 hodinu před Dx (10 mg/kg) a o 75 % a 0,85 po kombinované aplikaci ET-743 (0,1 mg/kg) 1 hodinu po Dx (10 mg/kg).

Tato data naznačují, že kombinace ET-743 a Dx může být účinná i u tumorů, které jsou pouze minimálně nebo vůbec citlivé na samostatné podání těchto léčiv a poskytují tak silný důvod pro provedení klinických zkoušek na použití této kombinace.

Příklad 2: Ecteinascidin 743 (ET-743) a Doxorubicin působí synergický cytotoxický účinek u buněčných linií sarkomů měkkých tkání HT-1080 a HS-18

U dvou buněčných linií sarkomů, HT-1080, fibrosarkomové linie citlivé na ET-743 ($IC_{50} = 10$ pm) a HS-18, liposarkomové linie s nižší citlivostí k ET-743 ($IC_{50} = 270$ pm) byl hodnocen toxický vliv ET-743 v kombinaci s jedním z následujících léčiv - doxorubicinem, trimetrexatem nebo paclitaxelem. Při použití ET-743 v kombinaci s každým z těchto léčiv při konstantním molárním poměru a následné analýze pomocí metody Chou a Talalay bylo dosaženo (po 72-hodinové inkubaci) synergického účinku u kombinace ET-743-doxorubicin, tento účinek se však neobjevil u kombinací ET-743 s trimetrexatem nebo paclitaxelem. Při 72-hodinové expozici buněk ET-743 a následné 48-hodinové expozici doxorubicinu, trimetrexatu nebo taxolu byl synergický účinek proti oběma sarkomovým buněčným liniím také získán u kombinace s doxorubicinem. Zajímavé bylo zjištění, že aplikace, kdy první byl podán paclitaxel a až následně ET-743 měla vyšší účinnosti, než aplikace provedená v opačném pořadí. Tyto výsledky podporují klinické studie na léčbu pacientů se sarkomem měkkých tkání pomocí kombinace doxorubicinu s ET-743 na základě zjištěné aktivity obou těchto léčiv proti tomuto typu onemocnění.

Příklad 3: Synergický cytotoxický účinek ET-743 a cisplatin

U Ecteinascidinu 743 (ET-743) byla prokázána výrazná protinádorová aktivita na několika preklinických systémech a vytvořila tak naději i na klinickou aktivitu. ET-743 váže N2 guaniny v malém žlábků dvoušroubovice DNA a ovlivňuje regulaci transkripce (Minuzzo et al., PNAS, Vol. 97,6780-84, 2000).

Předchozí studie ukázaly, že buňky s poruchou mismatch reparového aparátu (MMR) vykazují stejnou citlivost k ET-743 jako buňky s normální funkcí MMR. NER-deficientní buňky

s vysokou citlivostí k cisplatině (DDP) jsou 6- až 8-krát méně citlivé k ET-743. Na základě odlišnosti mechanismů zajišťujících (nádorové buňce) opravu defektů způsobených ET-743 a cisplatinou a vzhledem k potenciálnímu klinickému zájmu o tuto kombinaci, provedli jsme studii hodnotící cytotoxické účinky ET-743 a cisplatinu na několik lidských nádorových linií. V této studii byla použita buněčná linie karcinomu ovaria Igrove-1, její subtyp rezistentní k ET-743 (IG/PSC/ET) a buněčné linie karcinomu tlustého střeva HCT 116 (MMR-deficientní) a HCT11-ch3 (s normální funkcí MMR).

Buňky byly exponovány po dobu 1 nebo 24 hodin různými koncentracemi samostatně aplikovaného ET-743 nebo DDP nebo jejich kombinacemi a cytotoxický účinek byl po obarvení sulforothaminem B hodnocen pomocí kalorimetrické kvantifikace. U všech buněčných liniích byl v obou případech jednodinové i 24-hodinové inkubace pozorován synergický účinek. Zajímavé bylo zjištění, že u HCT116 rezistentního k DDP zřejmě ET-743 umožnilo zpětné dosažení senzitivity a to i v koncentracích, při kterých má při samostatné aplikaci minimální účinek. Shrnutí získaných dat poskytuje důvod k přistoupení ke klinickým zkouškám na kombinaci ET-743 s DDP.

Příklad 4: ET-743 v kombinacích s doxorubicinem, taxolem, SN-38, cisplatinou a gemcitabinem

Hodnotili jsme účinek ET-743 v kombinacích s doxorubicinem, taxolem, SN-38, cisplatinou a gemcitabinem proti panelu lidských nádorových buněčných linií. Tyto studie byly navrženy s cílem určit typ vzájemné interakce léčiv a to mezi ET-743 a standardními chemoterapeutiky a vliv pořadí podání jednotlivých léčiv na protinádorový účinek. K popisu typu vzájemné interakce léčiv bylo užito mnoho kombinací ET-743 se standardními cytotoxickými činidly bez použití modelového systému (Laska et al., *Biometrics* 50:834, 1994). Tyto studie ukazují, že bez ohledu na expozici se nejčastěji pozoruje aditivní typ vzájemné interakce léčivo-léčivo.

Synergický účinek při vzájemné interakci léčiv byl pozorován v případech, kdy kombinace s ET-743 byla použita proti buněčným liniím nemalobuněčnému karcinomu plic (předcházela expozice SN-38), osteosarkomu (preexpozice s ET-743, následně cisplatinou), karcinomu prsu (preexpozice s ET-743, následně gemcitabinem), karcinomu tlustého střeva (preexpozice s ET-743, následně SN-38 a současná expozice ET-743 a SN-38). Byl zaznamenán přechodný aditivní/synergický účinek při vzájemné interakci (preexpozice s ET-743, následně SN-38 u buněčné linie nemalobuněčnému karcinomu plic (NSCL); preexpozice s SN-38 u karcinomu střeva a NSCL; současná expozice ET-743 a cisplatinou u osteosarkomu a ET-743 a SN-38 u

NSCL). Antagonismus byl prokázán při současné užití ET-743 s taxolem u dvou NSCL linií a s doxorubicinem u rhabdomyosarkomové linie.

Tyto studie ukazují, že ET-743, které je ve druhé fázi klinických zkoušek, by se mohlo v kombinaci s několika cytotoxickými látkami používat proti širokému spektru nádorů.

Materiál a Metody

Buněčná kultura:

Nádorové buněčné linie lidského karcinomu prsu (MDA-435, MDA-231, T-470), nemalobuněčného karcinomu plic (NCI-H522, NCI-H226, NCI-H23), karcinomu tlustého střeva (HCT-116, HT-29, Colo-320), osteosarkomu (HOS, U-2, OS, SaOS-2), rhabdomyosarkomu (RH1, RH30, RD) byly vykultivovány v RPMI-1640 obohaceném o 10% fetální bovinní sérum a 2mM L-glutamin. Všechny kultivované kultury byly udržovány v kultivačních lahvích (75 cm²) při teplotě 37 °C ve zvlhčovaných inkubátorech v atmosféře s 5% podílem CO₂ a 95 % vzduchu.

Analýza IC₅₀:

Předem definované množství exponenciálně se množících nádorových buněk bylo inokulováno do 96-ti jamkových destiček pro tkáňové kultury a fixováno po dobu 24 hodin. Následně byla ke tkáňovým kulturám přidána destička s léčivou tvořenou postupným koncentračním ředěním ET-743 nebo standardních chemoterapeutik. Inkubace buněk byla provedena formou 24-hodinových expozic po dobu 3 dní s následným přidáním MTT na dobu 4 hodin. Krystaly, které vznikly, byly poté rozpuštěny kyselinou/alkoholem, absorbance (570 nm – vzorek/630 nm – kontrola) byla určena pomocí odečítacího systému pro mikrotitrační desku. Výsledky byly vyjádřeny jako procenta úmrtí nádorových buněk vztažená k průměrné hodnotě kontrol.

Kombinační studie:

Koncentrační schéma (koncentrace vyjádřená jako procenta z IC₅₀ jednotlivých léčiv) užitá pro charakterizaci typu vzájemné interakce léčiv v kombinačních studiích je ukázáno níže:

Koncentrace léčiva (vyjádřena v procentech IC ₅₀)	
<u>ET-743</u>	<u>Standardní léčivo</u>
100	0
75	25
60	40

50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

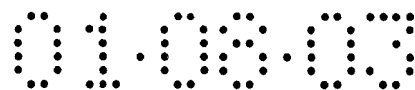
Statistická analýza kombinačních studií:

Statistická srovnání jsou provedena s každou testovanou kombinací (75:25 – ET-743/standard) a krajními hodnotami (100:0 – ET-743 a 0:100 – standardní účinné látky). Statisticky významné pozorování vyžaduje existenci rozdílu mezi hodnotou absorbance kombinace (mezi ET-743 a standardními účinnými látkami) a oběma krajními hodnotami (ET-743 a standardní účinné látky izolovaně). Pokud většina hodnot (≥ 3 z 5) je statisticky nad nebo pod definovanou hranicí, potom popisujeme antagonismus, respektive synergismus. Jiné rozložení naměřených hodnot odpovídá spíše aditivnímu účinku při vzájemné interakci. Velmi obtížná je interpretace v případě významného přiblížení ke spojnici krajních hodnot. Pokud sklon křivek pro IC_{50} jednotlivých látek je stejný (nepravděpodobné), potom je v daném případě možné určit typ interakce.

Postupné kombinace ET-743 s chemoterapeutiky		
Typ tumoru/buněčná linie	Podmínky expozice/léčivo	Zjištěná vzájemná interakce
<u>Osteosarkom</u>		
NOS	24 hodin ET-743, následně 24 hodin cisplatina;	Synergie
	24 hodin cisplatina, následně 24 hodin ET-743;	Aditivní účinek
	24 hodin současně ET-743 a cisplatina	Aditivní účinek
U2-OS	24 hodin ET-743, následně 24 hodin cisplatina;	Aditivní účinek
	24 hodin cisplatina, následně 24 hodin ET-743;	Aditivní účinek
	24 hodin současně ET-743 a cisplatina	Aditivní účinek
Sa06	24 hodin ET-743, následně 24	Aditivní účinek

	<p>hodin cisplatina; 24 hodin cisplatina, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a cisplatina</p>	<p>Aditivní účinek Aditivní účinek</p>
<u>Nemalobuněčný karcinom plic</u>		
NCB-H226	<p>24 hodin ET-743, následně 24 hodin taxol; 24 hodin taxol, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a taxol; 24 hodin ET-743, následně 24 hodin SN38; 24 hodin SN38, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a SN38;</p>	<p>Aditivní účinek Aditivní účinek Antagonismus Aditivní účinek/ Synergismus Aditivní účinek/ Synergismus Aditivní účinek</p>
NCB-N522	<p>24 hodin ET-743, následně 24 hodin taxol; 24 hodin taxol, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a taxol; 24 hodin ET-743, následně 24 hodin SN38; 24 hodin SN38, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a SN38;</p>	<p>Aditivní účinek Aditivní účinek Antagonismus Aditivní účinek/ Synergismus Aditivní účinek/ Synergismus Aditivní účinek</p>
NCB-N23	<p>24 hodin ET-743, následně 24 hodin taxol; 24 hodin taxol, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a taxol; 24 hodin ET-743, následně 24 hodin SN38;</p>	<p>Aditivní účinek/ Antagonismus Aditivní účinek Antagonismus Aditivní účinek</p>

	24 hodin SN38, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a SN38;	Synergismus Aditivní účinek/ Synergismus
<u>Karcinom prsu</u>		
MDA-435	24 hodin ET-743, následně 24 hodin gemcitabin; 24 hodin gemcitabin, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a gemcitabin;	Aditivní účinek Aditivní účinek Aditivní účinek
MDA-231	24 hodin ET-743, následně 24 hodin gemcitabin; 24 hodin gemcitabin, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a gemcitabin;	Aditivní účinek Aditivní účinek Aditivní účinek
T47-8	24 hodin ET-743, následně 24 hodin gemcitabin; 24 hodin gemcitabin, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a gemcitabin;	Aditivní účinek Aditivní účinek Aditivní účinek
<u>Karcinom tlustého střeva</u>		
MCT-116	24 hodin ET-743, následně 24 hodin SN38; 24 hodin SN38, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a SN38;	Synergismus Aditivní účinek Aditivní účinek
NT-29	24 hodin ET-743, následně 24 hodin SN38; 24 hodin SN38, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a SN38;	Aditivní účinek Aditivní účinek Aditivní účinek



Colo-320	24 hodin ET-743, následně 24 hodin SN38; 24 hodin SN38, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a SN38;	Aditivní účinek Aditivní účinek/ Synergismus Synergismus
<u>Rhabdomyosarkom</u>		
RN1	24 hodin ET-743, následně 24 hodin doxorubicin; 24 hodin doxorubicin, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a doxorubicinu;	Aditivní účinek Aditivní účinek Antagonismus
RD	24 hodin ET-743, následně 24 hodin doxorubicin; 24 hodin doxorubicin, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a doxorubicinu;	Aditivní účinek Aditivní účinek Aditivní účinek/ Antagonismus
RN30	24 hodin ET-743, následně 24 hodin doxorubicin; 24 hodin doxorubicin, následně 24 hodin ET-743; 24 hodin současně ET-743 a doxorubicinu;	Aditivní účinek Aditivní účinek Antagonismus

Závěry

Tyto studie naznačují, že bez ohledu na pořadí expozice mezi ET-743 a standardními chemoterapeutiky, nejobvyklejším pozorovaným typem interakce léčivo-léčivo je Aditivní účinek.

Prokazatelný synergický účinek byl pozorován u preexpoziční SN-38 u NSCL buněčných linií NC1-H522 a NC1-H23, preexpoziční ET-743 při jeho kombinaci s cisplatinou u HOS osteosarkomu, s gemcitabinem u linie karcinomu prsu T-470, preexpoziční SN-38 u karcinomu tlustého střeva HCT-116 a současná expozice ET-743 a SN-38 u linie karcinomu tlustého střeva

Colo-320. Antagonismus byl prokázán při současné užití ET-743 s taxolem u NSCL linií NC1-H522 a NC1-H23 a s doxorubicinem u RHI rhabdomyosarkomové linie.

Příklad 5: Interakce mezi ET-743 a jinými látkami užívanými k léčbě nádorů

Ačkoliv ET-743 je v současné době ve stadiu klinických studií na léčbu nádorů u lidí, mechanismus jeho protinádorového účinku nebyl dosud plně objasněn. Cílem této studie bylo stanovit podstatu interakce mezi ET-743 a jinými protinádorovými účinnými látkami (doxorubicin; DXR, trimetrexát; TMTX a Paclitaxel; Taxol) pomocí metody kombinačního indexu (CI) Chou a Talalay. Pro lepší pochopení možností klinického využití ET-743 použila předkládaná studie SRB kvantitativní metodu pro in vitro testování cytotoxicity dosažené kombinací ET-743 s třemi dalšími protinádorovými látkami při užití v různých dávkovacích schématech u dvou linií sarkomů měkkých tkání, HT-1080 a HS-18. DXR jediný v kombinaci s ET-743 dosahoval synergie nezávislé na pořadí aplikace. Současná aplikace ET-743 s DXR vedla k synergickému účinku u obou buněčných linií.

CI (průměrné) pro dané dávkovací schéma 0,86, 0,83, 0,84 a 0,85 při 50%, 75%, 90% a 95% zániku buněk, respektive, u HT-1080 linie a 0,89, 0,74, 0,64 a 0,60 při 50%, 75%, 90% a 95% zániku buněk, respektive, u HS-18 linie. Pořadí, kdy 24-hodinová inkubace s ET-743 předcházela aplikaci doxorubicinu, se ukázalo jako nejúčinnější postup u obou buněčných linií; výsledkem byl soustavně nízký CI odpovídající až 90% hodnotě zániku nádorových buněk u obou linií. Účinný byl i postup, kdy expozice taxolu předcházela ET-743. Tyto výsledky naznačují vhodnost dalšího testování kombinace ET-743 s doxorubicinem v klinických studiích zaměřených na léčbu sarkomu měkkých tkání.

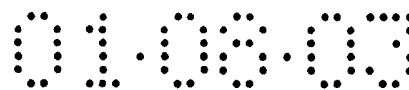
Materiál a metody

Chemikálie

Použité ET-743 poskytla Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, Madrid, Spain) a bylo připraveno/dodáno ve formě 2 mM roztoku v dimethylsulfoxidu. Paclitaxel a DXR byl získán od Sigma chemical Co. (St. Louis, MO) a TMTX poskytla Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich.).

Buněčná kultura

Buněčné linie sarkomu měkkých tkání, HT-1080 a HS-18, se nechaly narůst v jedné vrstvě v RP<I-1640 obsahující 10% fetální bovinní sérum.



SRB kvantifikace cytotoxicity

Cytotoxicita aktivních látek byla určena pomocí SRB kvantifikace cytotoxicity provedené v 96-jamkových mikrotitračních destičkách podle popsaného postupu. Buňky byly umístěny do jamek v duplikátu (5000 buněk/jamka) a vystaveny účinku léčiv o různých koncentracích. Buňky byly fixovány 50% roztokem TCA po dobu 1 hodiny a do každé jamky bylo přidáno 0,4% SRB (Sigma). Po 30-minutové inkubaci byly destičky promyty 1% kyselinou octovou a odečteny při 570 nm na odečítacím zařízení pro mikrotitrační destičky Biowhitaker microplate reader 2001. Jamky, které obsahovaly buňky, ale byly bez léčiva a jamky s médiem a léčivem, ale bez obsahu buněk, byly použity jako pozitivní a negativní kontrola, respektive.

Současná expozice ET-743 a DXR, TMTX nebo Paclitaxelu

Buňky byly umístěny do 96-jamkových destiček, jak je popsáno výše. Kultury byly ošetřeny sedmi různými koncentracemi jednoho léčiva nebo kombinací léčiv s molárním poměrem 1:100 (ET-743 : jiné léčivo). Po 72-hodinové expozici byla růstová inhibice měřena pomocí SRB kvantifikační metody.

Postupná expozice ET-743 a DXR, TMTX nebo Paclitaxelu

Za použití stejného experimentálního systému popsaného výše, jsme nechali na buňky působit tři různé koncentrace představující IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅ pro ET-743, DXR, TMTX a Paclitaxel, respektive. Po 24 hodinách přeexpozice ET-743 nebo kombinaci léčiv byl na dobu 48 hodin přidán druhý typ léčiva do příslušné jamky.

Analýza zastoupených fází buněčného cyklu

Exponenciálně rostoucí buňky byly ošetřeny v nebo bez přítomnosti léčiva po dobu několika hodin. Buňky byly poté sebrány a fixovány pomocí ledovým 70% methanolem. DNA byla obarvena propidiumbromidem, jak je popsáno výše. Desettisíc obarvených buněk bylo analyzováno na Becton Dickinson fluorescenčně aktivovaném buněčném porteru (FACS).

Určení synergismu a antagonismu a konstrukce isobologramu

CI byl vypočítán pomocí Chou-Talalayovi rovnice, která započítává jak potenci (D_m nebo IC₅₀), tak i tvar křivky závislosti účinku na dávce (hodnota m). Obecná rovnice pro klasický isobologram (CI = 1) je dána vztahem:

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

kde $(Dx)_1 + (Dx)_2$ ve jmenovateli jsou dávky (nebo koncentrace) pro samotné D_1 (ET-743) a D_2 (jiné léčivo) vytvářející $X\%$ inhibici, zatímco $(D)_1 + (D)_2$ v čitatelích jsou dávky ET-743 a jiného léčiva v kombinaci, také s hodnotou inhibice $X\%$ (tj. jsou isoefektivní). $CI < 1$, $CI = 1$, $CI > 1$ označují synergismus, aditivní účinek a antagonismus, v uvedeném pořadí.

$(Dx)_1 + (Dx)_2$ mohou být snadno spočítány podle rovnice pro střední účinek podle Chou a Chou et al.:

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

Kde Dm je dávka odpovídající střednímu účinku získaná z anti-log X -vymezení oblasti středního účinku, X -log (D) versus Y - log $[fa / (1 - fa)]$ nebo

$Dm = 10^{-(Y\text{-vymezení})/m}$, a m je sklon oblasti středního účinku. Software Chou a Chou umožňuje automatický výpočet hodnot m , Dm , Dx a CI . Z $(Dm)_1$, $(Dx)_2$ a $D_1 + D_2$ je snadné automaticky podle rovnice (A) sestavit isobologram.

Pro konzervativní vzájemně nevýjimečné isobologramy dvou aktivních látek, je k rovnici (A) přidán třetí výraz:

$$(D_1) (D_2) / (Dx)_1 + (Dx)_2.$$

Tento třetí výraz se obvykle pro zjednodušení vypouští a je potom indikováno vzájemně výjimečné převzetí nebo klasický isobologram. V částech Výsledek 2 a 3, jsou udány hodnoty CI získané z klasického (vzájemně exklusivního) výpočtu.

Výsledek 1

Cytotoxický účinek 4 léčiv na HT-1080 a HS-18			
IC ₅₀ pro lidský sarkom měkkých tkání			
		HT-1080	S-18
ET-743	(nM)	0,01	0,27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70 000
Paclitaxel	(nM)	1,3	10

Tato tabulka ukazuje, že obě buněčné linie HT-1080 i S-18 vykazovaly větší citlivost k ET-743 než k ostatním protinádorovým chemoterapeutikům.

Účinek každého z chemoterapeutik na distribuci fází buněčného cyklu u buněčné kultury HS-18 za 24 a 72 hodin po ošetření dávkou přibližně IC ₅₀					
Léčivo	Dávka	HR	% G1 fáze	% S fáze	% G2-M fáze

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 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

Účinek každého z chemoterapeutik na distribuci fází buněčného cyklu u buněčné kultury HT-1080 za 24 a 72 hodin po ošetření dávkou přibližně IC₅₀

Léčivo	Dávka	HR	% G1 fáze	% S fáze	% G2-M fáze
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

Výsledek 2 ukazuje CI pro buněčné linie HT-1080 a HS-18, které byly vystaveny současnému působení ET-743 a jednoho z protinádorových léčiv jako je DXR, TMTX nebo paclitaxel, s molárním poměrem kombinované směsi 1:100. Při ošetření buněk kombinací ET-743 a DXR byly všechny hodnoty CI pod 1, což ukazuje na synergický účinek kombinace u obou buněčných linií. CI (průměrné) s tímto dávkovací schématem byly 0,86, 0,83, 0,84 a 0,85 při 50%, 75%, 90% a 95% zániku buněk, respektive, u HT-1080 linie a 0,89, 0,74, 0,64 a 0,60 při 50%, 75%, 90% a 95% zániku buněk, respektive, u HS-18 linie. Tento výsledek ukázal, že současná expozice ET-743 a DXR vytváří synergický cytotoxický účinek. Naopak, v případě současné expozice buněk kombinací ET-743 s TMTX nebo s paclitaxelem byl pozorován antagonický cytotoxický účinek.

CI hodnota byla získána u obou buněčných linií, které byly počátečně ošetřeny ET-743 po dobu 24 hodin, s následnou expozicí DXR po dobu 48 hodin. U obou buněčných linií počáteční expozice ET-743 následovaná expozicí DXR vykazovala synergický účinek, hodnota CI pro HT-1080 při 80% zániku buněk byla $0,64 \pm 0,12$ a pro HS-18 při 88% zániku buněk byla $0,24 \pm 0,06$. Naopak, expozice DXR následovaná expozicí ET-743 (Výsledek 3a, spodní obrázek) vykazovala sice na počátku dobrou hodnotu CI, ale CI pro HT-1080 při 80% zániku buněk bylo $1,00 \pm 0,03$, což ukazuje, že účinek této kombinace byl aditivní a CI při vyšším podílu zaniklých buněk byl ve srovnání se střední hodnotou zániku buněk horší u obou linií.

Při expozici buněk ET-743 následované expozicí TMTX byly hodnoty CI pro HT-1080 blízké nebo přesahující 1, což ukazuje, že účinek těchto dvou látek je antagonický nebo aditivní. Naopak, hodnoty pro HS-18 nepřesahovaly 0,6, což ukazuje na synergický účinek obou látek. Při ošetření buněk kombinací v pořadí TMTX následovaným ET-743 byl u obou buněčných linií, HT-1080 a HS-18, zaznamenán aditivní účinek.

Expozice paclitaxelu následovaná expozicí ET-743 vedla k synergickému cytotoxickému účinku. Při expozici v tomto pořadí byla hodnota CI pro HT-1080 při 89% zániku buněk $0,92 \pm 0,06$ a pro HS-18 při 78% zániku buněk $0,38 \pm 0,13$.

Shrnutí

ET-743 je vysoce účinné proti buňkám sarkomů měkkých tkání, zejména proti maligní fibrosarkomové linii HT-1080.

DXR v kombinaci s ET-743 vytváří synergický účinek nezávislý na pořadí expozice, ale expozice ET-743 následovaná DXR se jeví jako účinnější u obou buněčných linií.

Expozice paclitaxelu následovaná expozicí ET-743 se také ukázala jako účinné proti buňkám lidských sarkomů měkkých tkání, avšak současná aplikace měla antagonický účinek.

Příklad 6: Kombinace chemoterapeutik s ecteinascidinem 743 (ET-743) požití in vivo u solidních nádorů

Bylo popsáno několik specifických mechanismů účinku ET-743 zahrnujících vazbu v malém žlábků DNA, alkylaci N2 guaninů, transkripční inhibici MDR1 genu (Jin et al., PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo et al., PNAS 97, 6780, 2000) a vliv na snížení aktivace jaderného receptoru SXR (Synold et al., Nature Med 7, 584, 2001). Samostatně, ET-743 inhibuje in vivo nádorový růst s dosažením kompletní remise u několika lidských nádorových linií/kmenů (Hendriks et al., Ann Oncol 10, 1233, 1999) zahrnujících melanom (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), karcinom ovaria

(HOC 22) a prsu (MX-1). Účinnost ET-743 v kombinaci s léčivými působícími jiným mechanismem může pomoci snížit toxicitu jednotlivých použitých léčiv nebo zvýšit účinnost léčiva u rezistentních nádorů nebo relapsů.

Pro zhodnocení významu účinku těchto kombinací bylo několik účinných látek zahrnujících doxorubicin (DXR; 8 mg/kg), cisplatinu (DDP; 12 mg/kg) a vinblastin (VINB; 6 mg/kg) podáno před/po ET-743 (0,2 mg/kg), kdy předcházelo ošetření buněk gdx5 1 hodinu před expozicí, u těchto nádorů: chondrosarkom (CSHA), osteosarkom (OSA-FH), fibrosarkom (SW 684), tumor ovaria (MRI-H-1834), NSCL (LX-1) a tumor ledviny (MRI-H-121) s účinkem definovaným jako < 50 % T/C. U dutovláknového modelu (hollow fiber - HF) vycházela kombinace DXR 1 hodinu před ET-743 konstantně účinnější než samotné podání ET-743 v případě chondrosarkomu (6 % vs. 10 %), fibrosarkomu (33 % vs. 48 %) a osteosarkomu (20 % vs. 34 %). Osteosarkomové xenografty vykazovaly podobné výsledky s 17 % vs. 43 %. HF studie s DDP ukázaly vyšší účinnost u ET-743 podaného před DDP ve srovnání se samotným podáním ET-743 v případě ovariálního nádoru (28 % vs. 100 %) a chondrosarkomu (15 % vs. 19 %) a stejnou účinnost u osteosarkomu (39 % T/C). Data získaná u xenograftů potvrzují, že podání ET-743 před DDP je účinnější než samotné podání ET-743 (35 % vs. 66 %). Výjimkou byl případ NSCL, kde samostatné podání ET-743 nebylo účinné (62 % T/C), ale podání DDP následované ET-743 vedlo k CR (<1 % T/C). U ledvinových xenograftů bylo samostatné podání ET-743 velmi účinné (22 % T/C), ale i podání ET-743 následované VINB vedlo k CR (<1 % T/C). Probíhají samostatné studie s dalšími standardními léčivými u xenograftů nádorů prsu, ledviny, žaludku a melanomu.

Příklad 7: Preklinická aktivita a biodistribuce kombinací ecteinascidinu 743 (ET-743) s doxorubicinem (DXR) u lidského rhabdomyosarkomu

ET-743 je první z nové třídy protinádorových látek s prokázanou protinádorovou aktivitou. Byla prokázána účinnost ET-743 u pacientů se sarkomem refrakterním k DXR a ifosfamidu. Vzhledem k potenciálu ET-743 jako účinného léčiva, zkoumali jsme (1) preklinickou protinádorovou aktivitu kombinace ET-743/DXR u lidského rhabdomyosarkomu a (2) možné vzájemné interakce léčiv a jejich biodistribuci u holé myši a v nádorovém xenograftu.

In vitro: Účinek každého ze dvou léčiv nebo jejich kombinace byl vyhodnocen po 1-hodinové expozici pomocí klonogenní kvantifikace. Samotný ET-743 nebo DXR vykazovaly protinádorovou aktivitu u buněčné linie TE 671. Kombinace, v souladu s isobologramem a

kombinačním indexem, měly při nejmenším aditivní účinek u několika nádorových linií, včetně TE 671.

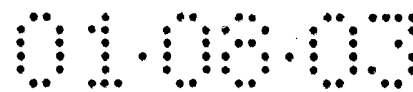
In vivo: Bolusové i.v. dávky (ET-743, 0,1 mg/kg; DXR, 10 mg/kg) byly podány holé myši v okamžiku, kdy tumor dosahoval přibližně 100 mg. Hodnoty poklesu hmotnosti tumoru/ \log_{10} počtu zaniklých buněk byly 46 %/0,132 u samostatné aplikace ET-743, 50 %/0,33 u samostatné aplikace DXR, 77 %/0,924 u současné aplikaci ET-743 a DXR, 82 %/1,12 po kombinované aplikaci ET-743 1 hodinu před DXR a 75 %/0,85 po kombinované aplikaci ET-743 1 hodinu po DXR. Synergický účinek byl také pozorován u myšího fibrosarkomu UV2237 a u jeho multirezistentního subtypu UV2237/ADR.

Tato data ukazují synergický účinek ET-743/DXR a tento účinek se zdá být v dalším vývoji nezávislý na pořadí aplikace léčiv i na kombinaci. Plasmatická koncentrace ani koncentrace DXR v tumoru se významně neliší při samostatné aplikaci DXR nebo v kombinaci s ET-743. Vyhodnocení farmakokinetiky (FK) ET-743 při izolovaném podání nebo v kombinaci s DXR se studuje. Kombinace ET-743 a DXR se chová doplňkově in vitro, avšak synergicky in vivo u rhabdomyosarkomu TE 671. FK profil DXR není ovlivněn současným podáním ET-743. Tato data poskytují důvod pro provedení iniciálních klinických zkoušek na použití této kombinace.

Příklad 8: ET-743 a cisplatina (DDP) vykazují in vitro a in vivo synergický účinek u buněčných linií lidského sarkomu a karcinomu ovaria

V tomto příkladě ukazujeme, že ET-743 zvyšuje účinnost DDP při použití in vitro i in vivo. V případě několika nádorových linií zahrnujících lidský karcinom střeva (HCT116), karcinom ovaria (Igrov-1, A2780), jejich rezistentní subtypy (Igrov-1/PSC-ET a 1A9, respektive) a rhabdomyosarkom (TE671) by nižší koncentrace samostatně aplikovaného ET-743 mohly až dvojnásobně zvýšit účinek DDP. Koncentrace odpovídající IC30/IC50 pro ET-743 vedou k doplňkovému nebo synergickému účinku. Tyto výsledky vyústily v in vivo studie s použitím xenograftových modelů s cílem zkoumání účinných kombinací léčiv s ET-743.

U s.c. transplantované TE671, která je částečně citlivá k samotnému ET-743 a DDP, kombinace těchto dvou léčiv vytvořila mnohem větší protinádorový účinek než byl dosažen při samotném užití každého z těchto léčiv v jejich MTD hodnotách. U ovariálního tumoru, který je za normálních podmínek rezistentní k ET-743 i DDP při izolovaném užití, vytvořila jejich kombinace růstovou inhibici tumoru větší než 50 %. U orthotopicky transplantovaného lidského ovariálního karcinomu HOC8 vytvářejícím nádorový rozsev v peritoneální dutině s ascitem a rezistentním k ET-743 a jenom částečně citlivým k DDP, kombinace těchto dvou léčiv vedla



k výraznému zvýšení přežití a to dokonce při ET-743 dávkách 0,05 mg/kg (1/4 MTD) a zároveň nezpůsobila žádnou významnou toxicitu. Při ET-743 dávkách 0,15 mg/kg výrazně vzrostlo přežití, ale došlo i k nárůstu toxicity projevující se poklesem hmotnosti, která byla významně vyšší než toxicita způsobená samostatným podáním léčiv.

Tyto výsledky předkládají pádný důvod pro naplánování klinických zkoušek pro užití kombinace ET-743 a DDP u sarkomů a karcinomů ovaria. In vitro a in vivo studie probíhají s cílem objasnit mechanismy synergického účinku mezi ET-743 a DDP u těchto typů nádorů.

Příklad 9: Vysoké dávky dexametasonu (dex) chrání před hepatotoxickým účinkem ecteinascidinu 743 (ET-743) u krys

ET-743, látka získaná z mořských tunikátů, je v současné době ve stadiu II. fáze klinických zkoušek. Vykazuje klinickou aktivitu proti sarkomům a předběžné výsledky předpokládají účinnost proti karcinomu prsu a ovaria. U většiny léčených pacientů však dochází k projevům hepatotoxicity charakterizované reversibilním zvýšením transamináz, u menším počtu případů dojde k cholestáze. U krys, která je ze zvířat nejvíce citlivá, je toxicita charakterizována jaterní nekrosou a zánětem žlučvodů. Na základě protizánětlivého účinku dex, jsme zkoušeli jeho vliv na jaterní poškození u krys vyvolané ET-743. Samicím krys kmene Wistar byla i.v. aplikována jedna dávka ET-743 (40 µg/kg). Některé krys dostaly před aplikací ET-743 jednu p.o. dávku dex 1, 5, 10 nebo 20 mg/kg za 24 hodin. Jaterní poškození a plazmatické hladiny alkalické fosfatázy (ALP), aspartátaminotransferázy (AST) a celkového bilirubinu (TB) byly určeny do tří dní od aplikaci ET-743. Běžné histologické řezy jaterní tkáně byly hodnoceny na světelném mikroskopu.

Dva dny po léčbě ET-743 jevila jaterní tkáň krys, které obdržely samotný ET-743, známky zánětu žlučvodů, výrazné degenerativní změny epitelu žlučvodů a byly patrné okrsky nekrosy jaterní tkáně. Plasmatické hladiny ALP a AST byly po dvou dnech významně zvýšeny. Cholestázu odráželo dramatické zvýšení plasmatické hladiny TB, ke kterému došlo 2 dny po aplikaci ET-743. K histopatologickým změnám a zvýšení plasmatického ALP, AST a TB vůbec nedošlo u krys, které byly předléčeny dávkou 10 nebo 20 mg/kg dex.

Zatímco dex v dávce 1 mg/kg byl protektivní jen málo, dávka 5 mg/kg dex měla už mírnou protektivitu. Plasmatické hladiny ET-743 u krys, které obdržely každý den dex (50 mg/kg) po celkovou dobu tří dní před aplikací ET-743, nebyly sníženy ve srovnání s krysami léčenými pouze samotným ET-743. Navíc, účinnost ET-743 proti melanomu implantovanému myši nebyla

dexamethasonem narušena. Tyto výsledky ukazují, že zařazení vysokých dávek dexamethasonu do ET-743 léčebného protokolu může snížit jeho hepatotoxicitu u pacientů léčených pro nádor.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Užití ET-743 k výrobě léku pro účinnou protinádorovou léčbu pomocí kombinované terapie využívající ET-743 s jiným léčivem.
2. Užití léčiva k výrobě léku pro účinnou protinádorovou léčbu pomocí kombinované terapie využívající toto léčivo s ET-743.
3. Užití podle nároku 1 nebo 2, kde kombinace ET-743 a léčiva působí synergicky.
4. Užití podle nároku 1, 2 nebo 3, kde ET-743 je součástí stejného léku nebo je k dispozici jako samostatný lék pro aplikaci ve stejný nebo jiný okamžik jako dané léčivo.
5. Užití podle jakéhokoliv z předcházejících nároků, kdy kombinovaná terapie používá ET-743 a antracyklin.
6. Užití podle nároku 5, kdy kombinovaná terapie používá ET-743 a doxorubicin.
7. Užití podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4, kdy kombinovaná terapie používá ET-743 a platinové sloučeniny s protinádorovým účinkem.
8. Užití podle nároku 7, kdy kombinovaná terapie používá ET-743 a cisplatinu.
9. Užití podle jakéhokoliv z předcházejících nároků, kdy kombinovaná terapie používá ET-743 a dexamethason.
10. ET-743 a protinádorové léčivo vyznačující se tím, že má synergickým účinkem s ET-743 po podání pacientovi s tumorem.