



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

*A61K 31/7088* (2006.01)*A61K 45/06* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61K 31/337* (2006.01)*A61K 31/17* (2006.01)*A61K 31/675* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006109210/15, 27.08.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.08.2004(30) Конвенционный приоритет:  
05.09.2003 IT MI2003A001714  
28.01.2004 US 60/539,344

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2007

(45) Опубликовано: 10.03.2009 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: EISSNER G, Blood. 2002 Jul 1; 100(1):  
334-40, Fludarabine induces apoptosis,  
activation, and allogenicity in human  
endothelial and epithelial cells: protective  
effect of defibrotide, реферат, PMID:  
12070045. WO 03101468 A (HOLLER) 11.12.2003.  
US 4693995 A, (NIADA) 15.09.1987.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
05.04.2006(86) Заявка РСТ:  
EP 2004/009723 (27.08.2004)(87) Публикация РСТ:  
WO 2005/023273 (17.03.2005)Адрес для переписки:  
119296, Москва, а/я 113, пат.пов. Э.П.Песикову

(72) Автор(ы):

ФЕРРО Лаура Ирис (IT),  
ИАКОБЕЛЛИ Массимо (IT),  
РИЧАРДСОН Пол (US)

(73) Патентообладатель(и):

ГЕНТИУМ С.П.А. (IT/IT) (IT)

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДЕФИБРОТИД,  
ОДИН ИЛИ В СОЧЕТАНИИ С ДРУГИМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СРЕДСТВАМИ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области лекарственных средств, в частности к составу, содержащему в качестве активных агентов дефибротид и, по крайней мере, один иной активный ингредиент, выбираемый из паклитаксела, монокроталина, BCNU (кармустина) и циклофосамида для лечения опухоли. Кроме того, изобретение относится к способу лечения

молочной железы, пораженной опухолью, характеризующемуся тем, что применяют в упомянутой молочной железе эффективное количество дефибротида посредством его внутривенного или внутривентриального введения в организм. Технический результат - синергетический эффект указанного состава. 2 н. и 10 з.п. ф-лы, 3 ил., 1 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

- (51) Int. Cl.  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 31/337* (2006.01)  
*A61K 31/17* (2006.01)  
*A61K 31/675* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006109210/15, 27.08.2004**

(24) Effective date for property rights: **27.08.2004**

(30) Priority:  
**05.09.2003 IT MI2003A001714**  
**28.01.2004 US 60/539,344**

(43) Application published: **10.10.2007**

(45) Date of publication: **10.03.2009 Bull. 7**

(85) Commencement of national phase: **05.04.2006**

(86) PCT application:  
**EP 2004/009723 (27.08.2004)**

(87) PCT publication:  
**WO 2005/023273 (17.03.2005)**

Mail address:  
**119296, Moskva, a/ja 113, pat.pov. Eh.P.Pesikovu**

(72) Inventor(s):  
**FERRO Laura Iris (IT),**  
**IAKOBELLI Massimo (IT),**  
**RICHARDSON Pol (US)**

(73) Proprietor(s):  
**GENTIUM S.P.A. (IT/IT) (IT)**

(54) **ANTICANCER MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING DEFIBROTIDE, ITSELF OR COMBINED WITH OTHER ANTICANCER DRUGS**

(57) Abstract:  
FIELD: medicine; pharmacology.  
SUBSTANCE: composition contains defibrofide as an active agent and at least one other active component chosen from paclitaxel, monocrotaline, BCNU (carmustine) and cyclophosphamide for cancer treatment. Besides invention refers to method of

breast cancer treatment, characterised by that effective amount defibrofide is applied for intravenous or intraperitoneal introduction in aforementioned affected breast.

EFFECT: synergetic effect of the specified composition.

12 cl, 2 dwg, 1 tbl

R U 2 3 4 8 4 1 3 C 2

R U 2 3 4 8 4 1 3 C 2

Предметом данного изобретения является способ лечения пораженной опухолью молочной железы путем введения в упомянутую железу эффективного количества дефибротида.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Термин "дефибротид" (далее DF) обычно означает полидеоксирибонуклеотид, который получают путем извлечения из тканей животного или растения (1, 2); этот полидеоксирибонуклеотид обычно применяется в виде соли щелочного металла, как правило, соли натрия, и имеет молекулярный вес около 45-50 кДа (регистрационный номер CAS 83712-60-1).

10 DF применяют, главным образом, из-за его антитромбозного действия (3), хотя его можно применять и в других случаях, например для лечения острой почечной недостаточности (4) и лечения острой миокардиальной ишемии. DF также применяют при лечении в клинических условиях, например для ослабления токсичности, связанной с высокими дозами режимов химиотерапии, в частности при печеночном веноокклюзионном синдроме (10, 11); DF показан для защитного действия при апоптозе, вызванном флударабином, и при аллоактивации эндотелиальных и эпителиальных клеток, причем без изменения антилейкемического эффекта флударабина (12); имеются также преклинические данные о защитном действии DF, которое достигнуто в модели эндотелиального нарушения, опосредствованного липополисахаридом (13).

20 В патентах США (6, 7) описывается способ получения DF, с помощью которого можно получать продукт, имеющий постоянные и хорошо определенные физико-химические характеристики, и который также свободен от возможных нежелательных побочных эффектов.

#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 В следующем исследовании DF рассматривается в сочетании с препятствующими росту опухолевых клеток цитотоксическими средствами в модели клеток карциномы молочной железы мыши EMT-6 и в эндотелиальных клетках быка, в культурах клеток и в экспериментальной модели, в которой были использованы крысы, подвергнутые воздействию высоких доз химиотерапии.

30 Экспозиция DF при концентрации 50 мг/мл либо до и во время, либо во время и после экспозиции клеток карциномы молочной железы мыши EMT-6 в культуре с помощью 4-гидропероксицикло-фосфамида (4НС) значительно повышает цитотоксичность 4НС и при уничтожении опухолевых клеток и концентрации 4НС между 50 и 250  $\mu$ моль может достигать приращения в 2 логарифмические единицы (см. фиг.1). Экспозиция DF при концентрации 50 мг/мл также приводит к возрастанию цитотоксичности тиотепы с явным различием, основанным на способе экспозиции. В частности, экспозиция клеток EMT-6 с помощью DF до и во время экспозиции тиотепы повышает цитотоксичность относительно опухолевых клеток на две логарифмические единицы для концентрации тиотепы между 100 и 250  $\mu$ моль. Выясняется интересный факт, что экспозиция клеток EMT-6 с помощью DF до и после экспозиции тиотепы приводит к повышению цитотоксичности, хотя и в меньшей степени, показывая возрастание цитотоксичности тиотепы между 0,5 и 1 логарифмической единицей. Подобный результат наблюдался с карбоплатином; однако экспозиция DF до и во время или во время и после экспозиции мелфалана не оказывает какого-либо значительного влияния на цитотоксичность мелфалана относительно клеток карциномы молочной железы мыши EMT-6 в культуре. С другой стороны, хотя и было показано, что цитотоксичность этих препятствующих росту опухоли алкилирующих агентов (AA) только относительно эндотелиальных клеток быка в культуре была подобна цитотоксичности, наблюдавшейся в клетках карциномы молочной железы EMT-6, не было выявлено повышение цитотоксичности, когда этот тип модели культуры клеток экспонировался алкилирующими агентами в сочетании с DF при концентрации 50 мг/мл.

50 Гепатотоксин монокроталин и алкилирующий агент кармустин (BCNU) поодиночке или в сочетании с DF испытывались *in vivo* в экспериментальной модели, в которой использовались крысы, несущие карциному молочной железы 13762. В этой

экспериментальной модели не проявлялась дополнительная токсичность у животных, когда они экспонировались этими агентами вместе с DF, но наблюдалось значительное замедление роста опухоли (TGD) (см. таблицу и фиг.2а и 2b).

Замедление роста опухоли у крыс, несущих карциному молочной железы 123762 после лечения монокроталином или BCNU, поодиночке или в сочетании с дефибротидом (DF). Опухоль была имплантирована в день 0, а химиотерапия применялась в день 8 и день 18.				
5	Опытная группа	Дни достижения опухолью 500 мм <sup>3</sup>	TGD (дни)	Значение p
	Контрольные группы	14,6±0,8	-	-
	Монокроталин (350 мг/кг), внутривенно, дни 8 и 18	15,6±1,0	1,0	0,435
	DF (200 мг/кг), внутривенно, дважды в день, дни 8-26, + монокроталин	16,1±0,6	1,5	0,134
10	DF (200 мг/кг) внутривенно, дважды в день, дни 10-26, + монокроталин	18,2±1,5	3,6	0,034
	BCNU (150 мг/кг), внутривенно, дни 8 и 18	18,0±2,5	3,4	0,195
	DF (200 мг/кг), внутривенно, дважды в день, дни 8-26, + BCNU	19,7±1,5	5,1	0,003
	DF (200 мг/кг), внутривенно, дважды в день, дни 10-26, + BCNU	21,3±1,6	6,7	0,0002

15 Эти исследования повторялись с применением монокроталина, BCNU и циклофосфамида (CTX) поодиночке или в сочетании с DF в той же самой экспериментальной модели. По сравнению с контрольной группой наблюдалось значительное замедление роста опухоли (TGD), когда применялся один DF ( $p < 0,05$ ); это замедление было особенно значительным, когда DF сочетался с CTX и BCNU ( $p < 0,4$ ), и было заметно большим, чем замедление, получаемое с помощью отдельного применения каждого агента. Неожиданно, когда DF применялся в одиночку, это сначала замедляло рост опухоли, но потом скорость роста опухоли снова становилась обычной. Кроме того, когда DF применялся в сочетании с AA, рост опухоли снова ускорялся, как только прекращалось совместное введение DF. Эти факты свидетельствуют не только о дополнительном противоопухолевом эффекте DF, но также и о непосредственной противоопухолевой активности DF самого по себе.

Замедление роста опухоли (TGD) и уменьшение количества легочных метастазов также наблюдали у мышей, несущих легочную карциному Левиса, когда при лечении паклитакселом добавляли DF, причем указанные явления наблюдались в любом случае - и при объединении с карбоплатином, и в сравнении с цитотоксической терапией, но без показания явного возрастания токсичности (данные не представлены). Механизм, лежащий в основе этих эффектов, еще ждет своего объяснения, но возможно, что здесь вовлекаются в процесс противоадгезивные свойства DF, оказывающие влияние на адгезию клеток в механизмах, причастных к устойчивости к лекарственному средству (8, 9).

Исследовался также вопрос, имеет ли DF активность *in vivo* в мышинной модели множественной миеломы (MM) человека. Шестидесят мышей SCID/NOD мужского пола (в возрасте 6-8 недель) были облучены (450 поглощенных доз) и через 24 часа инъецированы подкожно клетками  $5 \times 10^6$  MM-IS человеческой MM. После образования прощупываемых опухолей мыши были разделены на 6 групп (по 10 мышей в каждой), получающих: а) носитель; б) DF (внутривенно, 450 мг/кг b.i.d); в) мелфалан (MEL), 2,5 мг/кг внутривенно, еженедельно; г) циклофосфамид (CTX), 50 мг/кг, внутривенно, в дни 8, 10, 12, 20, 22 и 24; е) и ф) сочетание DF (300 мг/кг, внутривенно) с MEL или CTX соответственно. Через каждые 3 дня мыши проходили контроль массы тела, потенциальной токсичности и объема опухоли с помощью электронного толщиномера.

DF, как в виде одиночного агента, так и в сочетании с MEL или CTX, обладал хорошей толерантностью без геморрагических осложнений или потери массы тела ( $P > 0,05$ ) во всех группах. Основными опорными точками определения эффективности были: а) изменения объема опухоли и б) общее выживание (время до умерщвления подопытного животного, когда диаметр опухоли превысит 2 см). Лечение DF результировалось в значительно меньшем объеме опухолей, чем у контрольных мышей ( $P < 0,05$ ) для всех случаев сравнения с помощью анализа вариантности и последующих (post-hoc) испытаний; в сочетании с MEL и CTX он стимулирует значительно меньшие объемы опухолей, чем

соответствующая цитотоксичная химиотерапия одиночным агентом ( $P < 0,05$  для всех случаев сравнения). Анализ Каплана-Мейера на выживание показал, что введение DF, либо как одиночного агента, либо в сочетании с цитотоксичной химиотерапией (MEL или СТХ), ассоциировался со статистически существенной пролонгацией полного выживания в сравнении с контрольной группой, получавшей носитель, или группами, получавшими MEL или СТХ ( $P < 0,001$  для всех случаев сравнения, логарифмический ранговый критерий). Интересно, что исследования *in vitro* не показали значительного прямого *in vitro* цитотоксичного эффекта DF относительно клеток ММ, означающего, что наблюдаемая *in vivo* активность может происходить вследствие влияния на взаимодействие клеток ММ с их локальным микроокружением.

Эти многообещающие результаты показывают, что в этой химиотерапевтической модели ММ DF не обеспечивает защиту опухоли, но впервые создается доказательство принципа, что DF не только обладает *in vivo* противоопухолевой активностью по отношению к ММ, но также усиливает реакцию на цитотоксическое лечение. Это исследование дает понять, что активность DF против ММ возможна вследствие его влияния на взаимодействие клеток ММ с их микроокружением и создает основу для будущих клинических исследований DF в сочетании с другими агентами для лечения ММ и других неоплазий.

Следовательно, целью данного изобретения является способ лечения пораженного опухолью млекопитающего, предпочтительно человека, путем введения эффективного количества DF. DF можно вводить в сочетании с другим активным ингредиентом, обладающим противоопухолевым действием. Другой активный ингредиент, обладающий противоопухолевым действием, может выбираться из паклитаксела, монокроталина, BCNU, мелфалана и циклофосфамида.

Другие цели данного изобретения представляются подбором состава, содержащего DF и, по крайней мере, один иной активный ингредиент, обладающий противоопухолевым действием; составы предпочтительно должны иметь вид водных растворов, а еще более предпочтительно быть пригодными для внутривенного введения, а также содержать наполнители и содействующие вещества, известные в фармакологии.

Таким образом, в данном изобретении под термином "дефибротид" (DF) следует подразумевать любой олигонуклеотид и/или полинуклеотид, полученный с помощью извлечения из тканей животного и/или растения, в частности из молочной железы. Предпочтительно DF получают в соответствии со способом, описанным в патентах США (6, 7), которые введены сюда с помощью ссылок.

#### БИБЛИОГРАФИЯ

1. US-3,770,720
2. US-3,899,481
3. US-3,829,567
4. US-4,694,134
5. US-4,693,995
6. US-4,985,552
7. US-5,223,609
8. Carlo-Stella, C, Di Nicola, M., Magni M., et al., Defibrotide in Combination with Granulocyte Colony-stimulating Factor Significantly Enhances the Mobilization of Primitive and Committed Peripheral Blood Progenitor Cells in Mice. *Cancer Research*, 2002,62:6152-6157 (Month11Day1Year2002November 1, 2002).
9. Hazlehurst, L., Damiano, J., Buyuksal, I., Pledger, WJ., Dalton, W.S., Adhesion to fibronectin via b1 integrins regulates p27 kip 1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*, 2000; 19:4319-4327.
10. Richardson, P.O., Elias, A.D., Krishnan, A., et al. Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high - risk population. *Blood*, 1998; 92:737-44.
11. Richardson, P., Murakami, C, Jin, Z., et al.. Multi-institutional use of defibrotide in 88 patients after stem cell transplantation with severe veno-occlusive

disease and multi-system organ failure: response without significant toxicity in a high risk population and factors predictive of outcome. Blood, 2002; 100(13):4337-4343.

12. Eissner, G., Multhoff, G., Gerbitz, A., et al., Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. Blood, 2002; 100:334-340.

13. Falanga, A., Vignoli, A., Marchetti, M., Barbui, T., Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells. Leukemia, 2003; in press.

#### Формула изобретения

1. Состав, содержащий в качестве активных агентов дефибротид и, по крайней мере, один иной активный ингредиент, выбираемый из паклитаксела, монокроталина, BCNU (кармустина) и циклофосфамида для лечения опухоли.

2. Состав по п.1, отличающийся тем, что он является водным раствором.

3. Состав по п.1, отличающийся содержанием обычных наполнителей и/или содействующих веществ.

4. Состав по п.1, состоящий из двух различных составов, которые можно вводить отдельно, причем один из них содержит дефибротид, а другой содержит иной активный ингредиент, обладающий противоопухолевым действием.

5. Состав по п.1 как объединенный препарат для одновременного, отдельного или последовательного введения.

6. Способ лечения молочной железы, пораженной опухолью, характеризующийся тем, что применяют в упомянутой молочной железе эффективное количество дефибротида посредством его внутривенного или внутрибрюшинного введения в организм.

7. Способ по п.6, в котором дефибротид вводят в сочетании, по крайней мере, с одним иным активным ингредиентом, обладающим противоопухолевым действием.

8. Способ по п.7, в котором упомянутый иной активный ингредиент, обладающий противоопухолевым действием, выбирают из паклитаксела, монокроталина, BCNU, мелфалана и циклофосфамида.

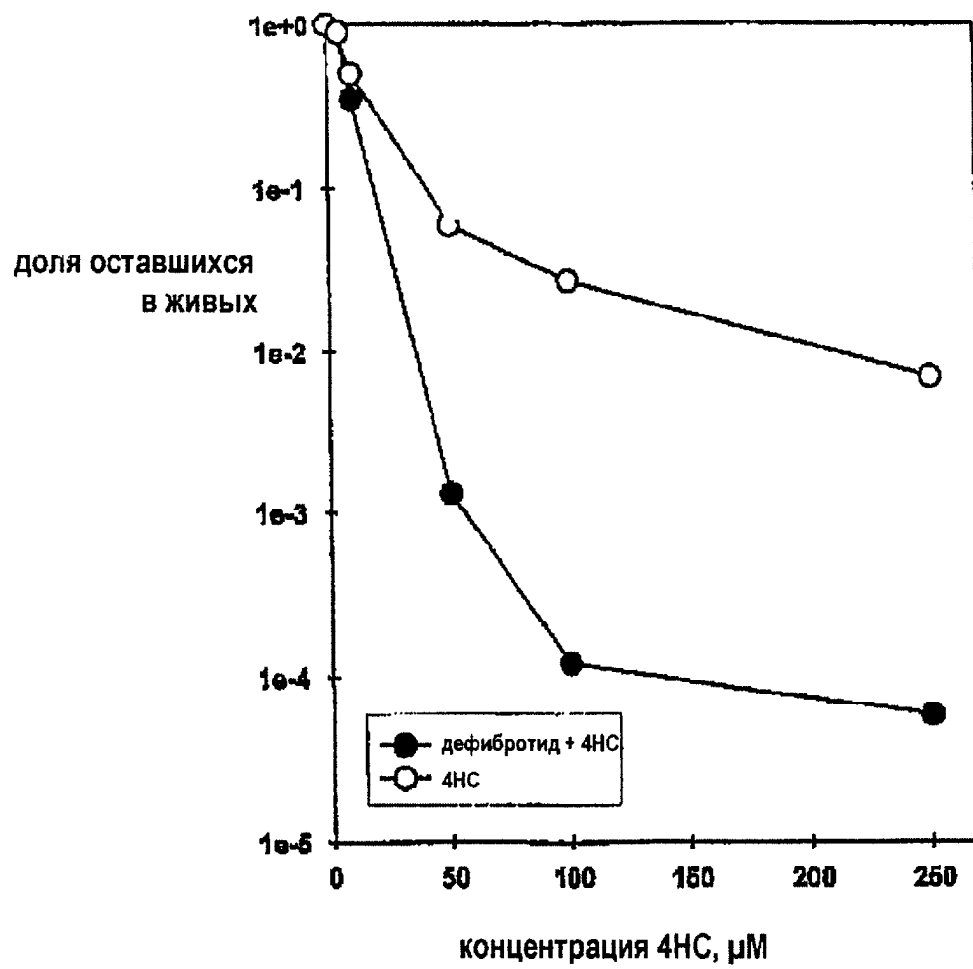
9. Способ по п.6, в котором упомянутая молочная железа является человеческой.

10. Способ по п.6, в котором упомянутая молочная железа поражена множественной миеломой.

11. Способ по п.6, в котором упомянутая молочная железа поражена мамиллярной карциномой.

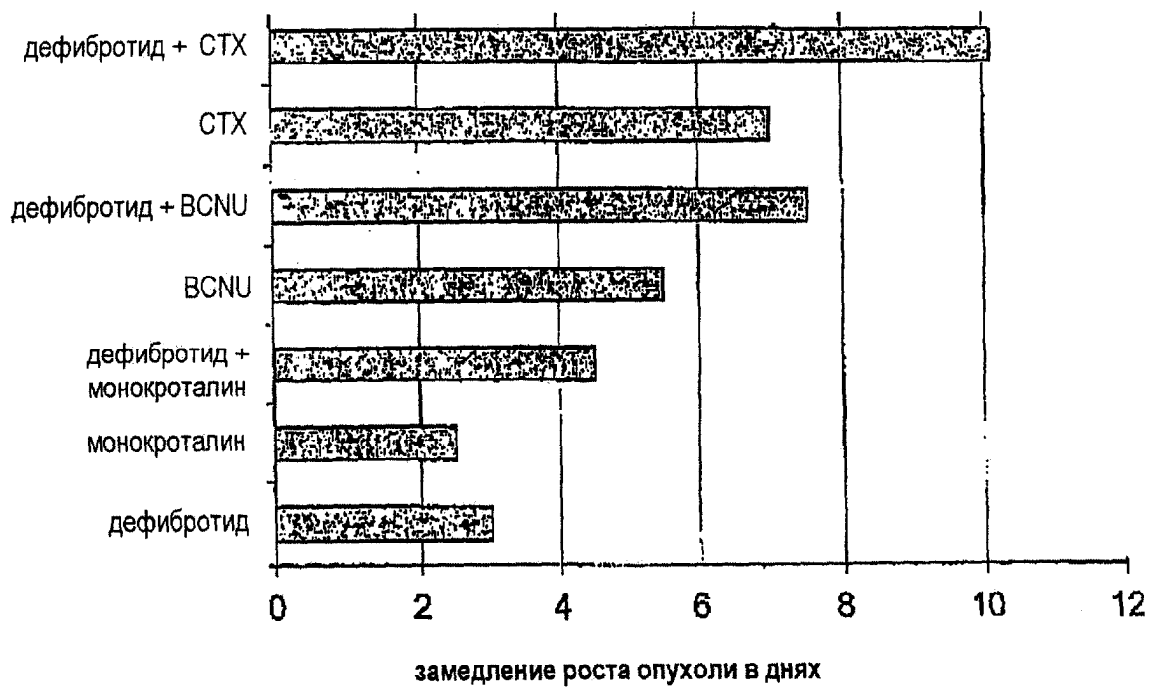
12. Способ по п.6, в котором дефибротид вводится внутривенно.

## Клетки карциномы молочной железы мыши ЕМТ-6



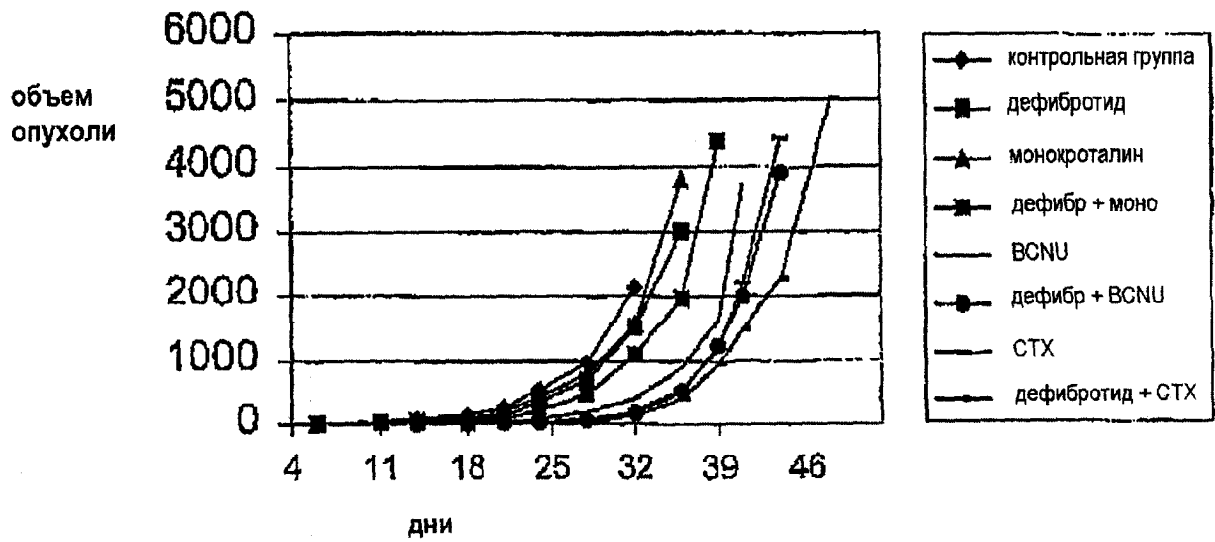
Фиг. 1

**Исследования эффективности дефибротида и его сочетаний**



**Фиг.2а**

**Исследования эффективности дефибротида и его сочетаний**



**Фиг.2b**