

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 107843 A  
7(51) A 61 K 35/00,  
45/06, 31/495

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ  
ЗА  
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107843  
(22) Заявено на 23.05.2003  
(24) Начало на действие  
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 246233 (32) 06.11.2000 (33) US  
248095 13.11.2000 US  
345982 19.10.2001 US

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 6 на 30.06.2004  
(45) Отпечатано на  
(46) Публикувано в бюлетин №  
на  
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

Pharma Mar, S.A.,  
Madrid (ES)

(72) Изобретател(и):

Naoto Takahashi  
New York, NY  
Steve Weitman  
San Antonio, TX (US)  
Maurizio D'Incalci  
Milan (IT)  
Glynn Thomas Faircloth  
Cambridge, MA (US)  
Rafaella Giavazzi  
Milan (IT)  
Andreas Gescher  
Brand Hill (GB)

(74) Представител по индустриална  
собственост:

Красимира Дамянова Цоцова, 1113 София,  
ул. "Ген. Щерю Атанасов" 5

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/GB2001/004902, 06.11.2001

(87) № и дата на PCT публикация:

WO2002/036135, 10.05.2002

BG 107843 A

(54) ЕФЕКТИВНО АНТИТУМОРНО ЛЕЧЕНИЕ

(57) Изобретението се отнася до използване на ектеинасцидин 743 (ET-743) за получаване на медикамент, предназначен за ефективно лечение на тумори при комбинирано лечение заедно с друго лекарствено средство.

10 претенции

23.05.00

## **ЕФЕКТИВНО АНТИТУМОРНО ЛЕЧЕНИЕ**

### **Област на техниката**

Настоящото изобретение се отнася до методи за ефективно антитуморно лечение.

Ектеинасцидин 743, ET-743, представлява противораково средство, получено от морски организъм.

### **Предшестващо състояние на техниката**

Настоящото изобретение е свързано с WO0069441, публикуван на 23.11.2000 г. за информация относно състави и приложение на ET-743 при лечение на рак. Този текст е даден за сравнение.



**Техническа същност на изобретението**

Съгласно един аспект, настоящото изобретение се отнася до методи за ефективно комбинирано лечение на базата на ектеинасцидин 743, ET-743, при използване на други лекарства.

**Предпочитани аспекти**

Другите лекарства могат да представляват част от същия състав или да се прилагат като отделен състав, който да бъде администриран по същото или по друго време. Същността на другото лекарство не е особено ограничена, като подходящите лекарства могат да включват:

(а) лекарства с антимиотични ефекти, особено такива, които са насочени към цитоскелетни елементи, включително микротубулни модулатори, като таксанови лекарства (като таксол, паклитаксел, таксотер, доцетаксел), подофилотоксини или *vinca* алкалоиди (винкрестин, винбластин);

(б) антиметаболитни лекарства, като 5-флуорурацил, цитарабин, гемцитабин, пуринови аналози, като пентостатин, метотрексат);

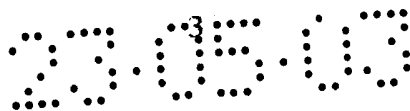
(в) алкилиращи агенти, като азотни мустарди (като циклофосфамид или ифосфамид);

(г) лекарства, насочени към деоксирибонуклеиновата киселина, като антрациклиновите лекарства адриаамин, доксорубин, фарморубин или епирубин;

(д) лекарства, насочени към топоизомеразите, като етопозид;

(е) хормони и хормонни агонисти или антагонисти, като естрогени, антиестрогени (тамоксифен и съответни съединения) и андрогени, флутамид, леупрорелин, гoserelin, cипротрон или октреотид;

(ж) лекарства, насочени към пренасяне на сигнал в туморни клетки, включително производни на антитела, като херцептин;



(з) алкилиращи лекарства, като платинови лекарства (цис-платина, карбоплатина, оксалиплатина, параплатина) или нитрозокарбамиди;

(и) лекарства, които силно действат на метастази на тумори, като инхибитори на матрична металопротеиназа;

(й) генна терапия и антисензорни средства;

(к) антитела – терапевтици;

(л) други биоактивни съединения с морски произход, особено дидемнини, като аплидин;

(м) стероидни аналози, в частност, дексаметазон;

(н) противовъзпалителни лекарства, в частност, дексаметазон; и

(о) антиеметични лекарства, в частност, дексаметазон.

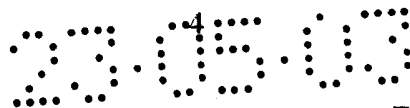
Като част от настоящата патентна спецификация са включени серии от примери, които следват. Тези примери показват повишената ефективност на ET-743, когато е използван в комбинация с други лекарства, както и се отнасят до различни комбинации, при които се използва ET-743.

Пример 1 се отнася до ефективни комбинации на ET-743 и доксорубин за инхибиране на туморен растеж при миша и човешка саркома на мишки без тимус.

В Пример 2 е показано, че етеинасцидин 743 (ET-743) и доксорубин проявяват синергични цитотоксични ефекти саркома клетъчните линии HT-1080 и HS-18 в меки тъкани.

Тези два примера показват повече от адитивни ефекти на комбинацията от ET-743 с антрациклини (в частност, доксорубин), която е по-ефективна от самостоятелно прилаганите агенти спрямо тумори при човека (при настоящите специфични експерименти – саркома), които ефекти се проявяват независимо от последователността на администриране. Тези резултати показват ясна перспектива за лечение на пациенти.

В Пример 3 е показан синергичен цитотоксичен ефект на ET-743 и цис-платина.



В Пример 4 е направена оценка на ET-743 в комбинация с химиотерапевтични средства спрямо панел от човешки туморни клетъчни линии, в частност, ET-743 комбинации с доксорубицин, таксол, SN-38, цис-платина и гемцитабин.

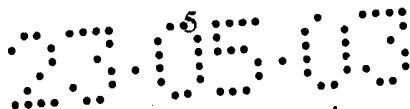
Тези двата показват повече от адитивни ефекти на комбинацията от ET-743 с платинови антитуморни съединения (в частност, цис-платина) с нуклеозидния аналог гемцитабин и с инхибитор на топоизомераза II (SN-38, който представлява активен агент, получен от прекурсора CPT-11, лекарство от групата на камптотецина). Тези комбинации са по-ефективни от самостоятелно взетите лекарства спрямо човешки тумори (при настоящите специфични експерименти – спрямо различни туморни клетки, като клетки на яйчник, колон, бял дроб, гърда, саркома на кости), които ефекти зависят от последователността на прилагане. Това е перспектива за лечение на пациенти.

Интересно е, че синергичното действие не е ясно предсказуемо: В Пример 4 е показано, че в повечето от тестваните комбинации не се наблюдава синергизъм (фактически, в някои случаи се наблюдава антагонизъм).

Пример 5 се отнася до оценка на комбинациите от ET-743 с доксорубицин или триметрексат или паклитаксел.

Той показва повече от адитивни ефекти на комбинацията от ET-743 с антрациклини (в частност, доксорубицин), която е по-ефективна от самостоятелно взетите лекарства спрямо човешки тумори (при настоящите специфични експерименти – спрямо саркома), които ефекти се проявяват независимо от последователността на администриране. Тези резултати показват ясна перспектива за лечение на пациенти.

Примери от 6 до 8 подсилват и допълват предишните примери и, по-специално, показват синергизма на ET-743 и доксорубицин и, също така, на ET-743 и цис-платина.



В Пример 9 е показан различен вид ефективност на комбинациите, съгласно настоящото изобретение, където висока доза дексаметазон защитава срещу хепатотоксичност на ET-743.

С други думи, настоящото изобретение се отнася до състави, методи за лечение, методи за получаване на съставите и съответните съединения.

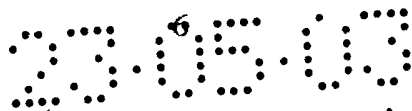
Настоящото изобретение се отнася и до приложение на съединенията, съгласно настоящото изобретение, в метод за лечение и до приложение на съединенията за получаване на състав за лечение на рак.

Следователно, настоящото изобретение се отнася до метод за лечение на бозайник, по-специално, човек, засегнат от рак, характеризиращ се с това, че включва администриране върху засегнатия индивид на терапевтични ефективно количество съединение, съгласно настоящото изобретение, или на негов фармацевтичен състав.

Настоящото изобретение се отнася и до фармацевтични състави, включващи фармацевтично приемлив носител, които съдържат като активен ингредиент съединение или съединения, съгласно настоящото изобретение, както и до методи за тяхното получаване.

Примерите за фармацевтични състави включват твърди форми (таблетки, хапчета, капсули, гранули и т.н.) или течни форми (разтвори, суспензии или емулсии) с подходящ състав за орално, локално или парентерално администриране, и могат да съдържат чистото съединение или в комбинация с носител или други фармакологично активни съединения. Тези състави трябва да бъдат стерилни, когато се администрат парентерално.

Администрирането на съединенията или съставите, съгласно настоящото изобретение, може да се осъществи по кой да е подходящ метод, като интравенозна инфузия, орално приемане, интраперитонеално и интравенозно администриране. Предпочита се, времето за инфузия да бъде до 24, повече се предпочита, от 2 до 12 часа, като най-много се предпочита, от 2 до 6 часа. Кратките времена за инфузия, които позволяват лечението да се провежда без



пренощуване в болница, особено се предпочитат. Ако е необходимо, обаче, времето за инфузия може да бъде от 12 до 24 часа и даже по-дълго. Инфузията може да се провежда на подходящи интервали от 2 до 4 седмици. Фармацевтичните състави, съдържащи съединенията, съгласно настоящото изобретение, могат да бъдат доставяни под форма на липозоми или наносфери в състави за задържано освобождаване или по други стандартни начини за доставяне.

Коректната дозировка на съединенията варира в зависимост от отделния състав, начина на прилагане и отделните *situs*, приемника и лекувания тумор. Под внимание се взимат и други фактори, като възраст, телесно тегло, пол, хранителен режим, време за администриране, скорост на отделяне, състояние на пациента, лекарствена комбинация, реакции на чувствителност и тежест на заболяването. Администрирането може да се провежда непрекъснато или периодично в рамките на максималната поносима доза.

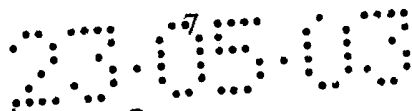
Комбинациите, съгласно настоящото изобретение могат да бъдат прилагани върху пациенти с упорито заболяване. Читателят може да се отнесе до WO0069441 за информация относно дозичните схеми за ET-743 и за друга информация за приложение в комбинираното лечение, съгласно настоящото изобретение.

### **Примери за изпълнение на изобретението**

#### Пример 1

**Ефективни комбинации на ET-743 и доксорубицин за инхибиране на туморен растеж при миша и човешка саркома в мишки без тимус**

ET-743 е потвърдил клинична активност при пациенти със саркома на меките тъкани и костите, трудно лечима с химиотерапия, включваща



доксорубицин (Dx) и изосфамид. От гледна точка на потенциална клинична стойност при комбиниране на ET-743 с доксорубицин, установено е действие на тази комбинация спрямо миша фибросаркома UV2237, нейна mdr-устойчива подлиния UV2237/ADR и човешки зенографт на рабдомиосаркома TE671. И ET-743 и доксорубицинът поотделно са ефективни спрямо миша фибросаркома UV2237, докато всеки от тях не е активен или е крайно активен както спрямо mdr-устойчивата подлиния UV2237/ADR, така и спрямо човешкия зенографт на рабдомиосаркома TE671. Комбинацията на ET-743 и доксорубицин, обаче, е ефективна във всичките три модела. Синергизмът е особено забележим в човешка рабдомиосаркома TE671 и изглежда независим от последователността на лекарствата или комбинацията.

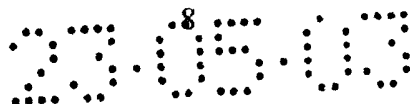
След единични интравенозни процедури, приложени, когато понижението на теглото на тумора (TWI) TE671 е приблизително 100 mg и стойностите на Log 10 Cell Kill (LCK) са съответно 46% и 0.132 за ET-743 (0.1 mg/kg) самостоятелно, 50% и 0.33 за доксорубицин (10 mg/kg) самостоятелно, 77% и 0.924 за ET-743 (0.1 mg/kg) и доксорубицин (10 mg/kg), прилагани едновременно, 82% и 1.12 за комбинация на ET-743 (0.1 mg/kg), давана един час преди доксорубицин (10 mg/kg) и 75% и 0.85 за комбинация на ET-743 (0.1 mg/kg), давана един час след доксорубицин (10 mg/kg).

Посредством тези данни се предполага, че комбинацията на ET-743 и доксорубицин може да бъде ефективна и при тумори, които не са чувствителни или са крайно чувствителни към тези лекарства, прилагани самостоятелно, което води до ясна обосновка на клиничните изпитания при използване на тази комбинация.

### Пример 2

**Ектеинасцидин 743 (ET-743) и доксорубицин продуцират синергични цитотоксични ефекти при линии HT-1080 и HS-18 на саркома в меки тъкани**





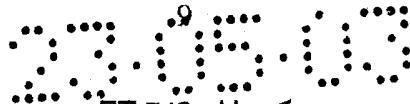
Две клетъчни линии на саркома, HT-1080, клетъчна линия на фибросаркома, чувствителна на ET-743 ( $IC_{50}=10 \mu\text{m}$ ) и HS, клетъчна линия на липосаркома, по-малко чувствителна на ET-743 ( $IC_{50}=270 \mu\text{m}$ ) се изследват за токсичност от ET-743 в комбинация с доксорубин, триметрексат или паклитаксел. Когато ET-743 се използва в комбинация с всяко от тези лекарства в постоянно молно съотношение и се анализира по метода на Chou и Talalay, при комбинацията ET-743-доксорубин се получават синергични ефекти (72 часа инкубиране), които не се получават при комбинациите на ET-743 с триметрексат или паклитаксел. Когато клетките се излагат на ET-743 в продължение на 72 часа и на доксорубин, триметрексат или таксол в продължение на 48 часа инкубиране, спрямо двете клетъчни линии на саркома също се получават синергични ефекти с доксорубин. Интересно е, че последователността паклитаксел, последван от ET-743, е по-ефективна от обратната последователност. Тези резултати поощряват клиничните опити на доксорубин в комбинация с ET-743 за лечение на пациенти със саркома на меките тъкани, като и двете лекарства показват активност спрямо тази болест.

### Пример 3

#### **Синергичен цитотоксичен ефект на Ектеинасцидин 743 (ET-743) и цис-платина**

Ектеинасцидин 743 (ET-743) показва забележителна антитуморна активност в различни предклинични системи и многообещаваща клинична активност. Ектеинасцидин 743 (ET-743) свързва азотни гуанини в минимално количество и действа за регулиране на възпроизвеждането (Minuzzo et al., PNAS, Vol. 97, 6780-84, 2000).

Предишни изследвания показват, че лошо изградените (MMR) дефицитни клетки са еднакво чувствителни на ET-743, както и нормалните клетки. NER дефицитните клетки, силно чувствителни към цис-платина, са от 6



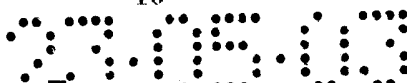
до 8 пъти по-чувствителни към ET-743. На база на различните механизми, включени в изграждането на ET-743 и цис-платина и поради големия клиничен интерес към тази комбинация, са проведени изследвания за оценка на цитотоксичните ефекти на ET-743 и цис-платината в различни човешки туморни клетъчни линии. В това изследване са използвани клетъчна линия на рак на яйчник при човек Igrove-1, подлиния, резистентна към ET-743 (IG/PSC/ET), клетъчни линии на рак на колона при човек HCT 116 (дефицит на MMR) и HCT11-ch3 (нормални MMR).

Клетките се третират в продължение на 1 или 24 часа с различни концентрации ET-743 или цис-DDP, поотделно или в комбинации и се измерва цитотоксичността при използване на колориметричен анализ след оцветяване със сулфородамин В. Във всички клетъчни линии се наблюдава синергичен ефект при третиране, както един, така и 24 часа. Интересно е, че в HCT116, резистентни на цис-DDP, ET-743 очевидно е способен да обърне чувствителността даже при концентрации на ET-743, които самостоятелно са крайно ефективни. Взети заедно, данните са рационални за извършване на клинични изследвания комбинирайки ET-743 с цис-DDP.

#### Пример 4

**Комбинации на Ектеинасцидин 743 (ET-743) с доксорубицин, таксол, Sn-38, цис-платина и гемцитабин**

ET-743 се оценява в комбинация с доксорубицин, таксол, Sn-38, цис-платина и гемцитабин спрямо панел от човешки туморни клетъчни линии. Посредством тези изследвания се определя вида на лекарственото взаимодействие между ET-743 и стандартните химиотерапевтични средства и влиянието на последователността на прилагане върху антитуморната активност. Използвани са различни комбинации на ET-743 със стандартни цитотоксични средства (Laska, *et al.*, *Biometrics* 50:50:834, 1994) за описание на



лекарственото взаимодействие. Тези изследвания показват, че независимо от последователността на прилагане, най-често се наблюдава адитивен ефект на лекарствено взаимодействие.

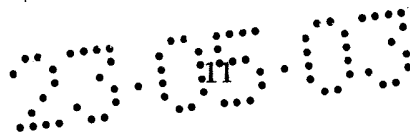
Синергично лекарствено взаимодействие се наблюдава, когато ET-743 се комбинира за да въздейства върху клетъчните линии на тумори на бял дроб (предварително прилагане на SN-38), остеосаркома (предварително прилагане на ET-743 последвано от цис-платина), на гърда (предварително прилагане на ET-743 последвано от гемцитабин), на дебело черво (предварително прилагане на ET-743 последвано от SN-38 и конкурентно прилагане на SN-38). Наблюдава се адитивен/синергичен (предварително прилагане на ET-743 последвано от SN-38 спрямо NSCL; предварително прилагане на SN-38 спрямо колон и NSCL; конкурентно прилагане на цис-платина спрямо остеосаркома, и на SN-38 спрямо NSCL линии) ефект на лекарствено взаимодействие. Доказателство за антагонизъм се забелязва, когато конкурентно се прилага таксол спрямо две NSCL линии и доксорубин спрямо клетъчната линия на рабдомиосаркома.

Тези изследвания показват, че ET-743, който е във Фаза II на клиничните изследвания, може да се комбинира с различни цитотоксични агенти и да влияе на широк спектър от туморни видове.

## **Материали и методи**

### Клетъчна култура

Туморни клетъчни линии на човешка гърда (MDA-435, MDA-231, T-470), бял дроб (NCI-H522, NC1-H226, NCI-H23), колон (HCT-116, HT-29, Colo-320), остеосаркома (HOS, U-2, OS, SaOS-2), рабдомиосаркома (RH1, RH-30, RD) се отглеждат в RPMI-1640, обогатена с 10% ембрионален волски серум 2 mM L-глутамин. Всички изходни култури се държат в колби от 75 cm<sup>2</sup> при 37°C във влажни инкубатори в атмосфера на 5% въглероден двуокис – 95% въздух.



### IC<sub>50</sub> анализ

Предварително определен брой експоненциално нарастващи туморни клетки се инкубират в в плочки с 96 гнезда с тъканна култура и се оставят да се стабилизират в продължение на 24 часа. След това, лекарствена плочка, съдържаща серия от различни концентрации на ET-743 или стандартни химиотерапевтични средства се прибавя към клетките. Клетките се инкубират като 24-часово излагане в продължение на 3 дни, последвано от прибавяне на МТТ в продължение на 4 часа. Получените формазанови кристали след това се солюбилизират с киселина/алкохол при поглъщане (570 nm - получено/630 nm - за сравнение), определено при използване на записвач. Резултатите се представят като процент умъртвени туморни клетки по отношение на контролната среда.

### Изследвания на комбинациите

За изследванията на комбинациите се използва показаната по-долу концентрационна схема (показана като процент от IC<sub>50</sub> на отделните агенти) за охарактеризиране на вида на взаимодействието:

**Лекарствена концентрация (показана като процент от IC<sub>50</sub>)**

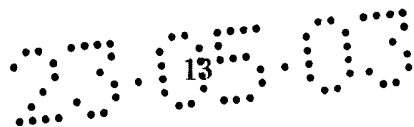
| <u>ET-743</u> | <u>Стандартни агенти</u> |
|---------------|--------------------------|
| 100           | 0                        |
| 75            | 25                       |
| 60            | 40                       |
| 50            | 50                       |
| 40            | 60                       |
| 25            | 75                       |
| 0             | 100                      |
| 0             | 0                        |

Статистически анализ на изследванията на комбинациите

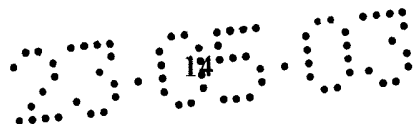
За всяка изследвана комбинация (75:25 ET-743/стандартни агенти), както и за крайните случаи (100:0 ET-743 и 0:100 стандартни агенти) се правят статистически сравнения. При статистическото наблюдение се установява, че съществува разлика между стойността на поглъщане на комбинацията (ET-743 и стандартни агенти) и двете крайни стойности (ET-743 и стандартните агенти поотделно). Ако болшинството ( $\geq 3$  от 5) стойности са статистически над или под линията, тогава съществува, съответно, антагонизъм или синергизъм. Иначе ефектът повече се доближава до адитивно взаимодействие. Интерпретирането е много трудно, ако съществува значителен наклон към линията, свързваща крайните положения. Ако наклонът на кривите на  $IC_{50}$  за отделните агенти е идентичен (малко вероятно), понякога, се определя видът на взаимодействието.

Последователност на комбинациите на ET-743 с химиотерапевтични средства

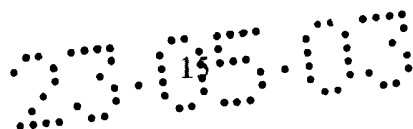
| Вид на тумора/<br>Клетъчна линия | Условия на прилагане/Средства                       | Наблюдавано<br>лекарствено<br>взаимодействие |
|----------------------------------|---|--|
| <u>Остеосаркома</u>              |   |  |
| NOS                              | 24 часа ET-743, последван от 24 часа цис-платина    | Синергично                                   |
|                                  | 24 часа цисплатина, последвана от 24 часа ET-743    | Адитивно                                     |
|                                  | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/цис-платина | Адитивно                                     |
| U2-OS                            | 24 часа ET-743, последван от 24 часа цис-платина    | Адитивно                                     |
|                                  | 24 часа цисплатина, последвана от 24 часа ET-743    | Адитивно                                     |
|                                  | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/цис-платина | Адитивно                                     |



|                           |   |                             |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Sa06                      | 24 часа ET-743, последван от 24 часа цис-платина    | Адитивно                    |
|                           | 24 часа цисплатина, последвана от 24 часа ET-743    | Адитивно                    |
|                           | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/цис-платина | Адитивно/<br>Синергично     |
| <u>Клетки на бял дроб</u> |   |                             |
| NCB-N226                  | 24 часа ET-743, последван от 24 часа таксол         | Адитивно                    |
|                           | 24 часа таксол, последван от 24 часа ET-743         | Адитивно                    |
|                           | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/таксол      | Антагонистично              |
|                           | 24 часа ET-743, последван от 24 часа SN38           | Адитивно/<br>Синергично     |
|                           | 24 часа SN38, последван от 24 часа ET-743           | Адитивно/<br>Синергично     |
|                           | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/ SN38       | Адитивно                    |
| NCB-N522                  | 24 часа ET-743, последван от 24 часа таксол         | Адитивно                    |
|                           | 24 часа таксол, последван от 24 часа ET-743         | Адитивно                    |
|                           | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/таксол      | Антагонистично              |
|                           | 24 часа ET-743, последван от 24 часа SN38           | Адитивно/<br>Синергично     |
|                           | 24 часа SN38, последван от 24 часа ET-743           | Адитивно/<br>Синергично     |
|                           | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/ SN38       | Адитивно                    |
| NCB-N23                   | 24 часа ET-743, последван от 24 часа Таксол         | Адитивно/<br>Антагонистично |

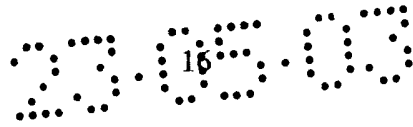


|                            |   |                         |
|----------------------------|---|-------------------------|
|                            | 24 часа таксол, последван от<br>24 часа ET-743        | Адитивно                |
|                            | 24 часа конкурентно прилагане на<br>ET-743/таксол     | Антагонистично          |
|                            | 24 часа ET-743, последван от 24 часа<br>SN38          | Адитивно                |
|                            | 24 часа SN38, последван от<br>24 часа ET-743          | Синергично              |
|                            | 24 часа конкурентно прилагане на<br>ET-743/ SN38      | Адитивно/<br>Синергично |
| MDA-435                    | 24 часа ET-743, последван от 24 часа<br>гемцитабин    | Адитивно                |
|                            | 24 часа гемцитабин, последван от<br>24 часа ET-743    | Адитивно                |
|                            | 24 часа конкурентно прилагане на<br>ET-743/гемцитабин | Адитивно                |
| MDA-231                    | 24 часа ET-743, последван от 24 часа<br>гемцитабин    | Адитивно                |
|                            | 24 часа гемцитабин, последван от<br>24 часа ET-743    | Адитивно                |
|                            | 24 часа конкурентно прилагане на<br>ET-743/гемцитабин | Адитивно                |
| T47-8                      | 24 часа ET-743, последван от 24 часа<br>гемцитабин    | Адитивно                |
|                            | 24 часа гемцитабин, последван от<br>24 часа ET-743    | Адитивно                |
|                            | 24 часа конкурентно прилагане на<br>ET-743/гемцитабин | Адитивно                |
| <b><u>Дебело черво</u></b> |   |                         |
| MCT-116                    | 24 часа ET-743, последван от 24 часа<br>SN38          | Синергично              |
|                            | 24 часа SN38, последван от<br>24 часа ET-743          | Адитивно                |



|                        |  |                             |
|------------------------|--|-----------------------------|
|                        | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/SN38         | Адитивно                    |
| NT-29                  | 24 часа ET-743, последван от 24 часа SN38            | Адитивно                    |
|                        | 24 часа SN38, последван от 24 часа ET-743            | Адитивно                    |
|                        | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/SN38         | Адитивно                    |
| Colo-320               | 24 часа ET-743, последван от 24 часа SN38            | Адитивно                    |
|                        | 24 часа SN38, последван от 24 часа ET-743            | Адитивно/<br>Синергично     |
|                        | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/SN38         | Синергично                  |
| <u>Рабдомиосаркома</u> |  |                             |
| RN1                    | 24 часа ET-743, последван от 24 часа доксорубицин    | Адитивно                    |
|                        | 24 часа доксорубицин, последван от 24 часа ET-743    | Адитивно                    |
|                        | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/доксорубицин | Антагонистично              |
| RD                     | 24 часа ET-743, последван от 24 часа доксорубицин    | Адитивно                    |
|                        | 24 часа доксорубицин, последван от 24 часа ET-743    | Адитивно                    |
|                        | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/доксорубицин | Адитивно/<br>Антагонистично |
| RN30                   | 24 часа ET-743, последван от 24 часа доксорубицин    | Адитивно                    |
|                        | 24 часа доксорубицин, последван от 24 часа ET-743    | Адитивно                    |
|                        | 24 часа конкурентно прилагане на ET-743/доксорубицин | Антагонистично              |





### Изводи-обобщение

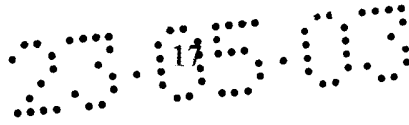
Тези изследвания показват, че независимо от последователността на прилагане на ET-743 и стандартните химиотерапевтични агенти, най-често се наблюдава адитивен ефект на лекарствено взаимодействие. Доказателство за синергизъм се наблюдава, когато на NCI-H522 и NCI-H23 NSCL клетъчните линии предварително се прилага SN-38, предварително се прилага ET-743 с цис-платина спрямо HOS туморна клетъчна линия на остеосаркома, T-470 клетъчна линия на гърда с гемцитабин, SN-38 спрямо HCT-116 туморна клетъчна линия на колон и конкурентно прилагане на SN-38 спрямо Colo-320 туморна клетъчна линия на колон.

Доказателство за антагонизъм се наблюдава, когато се прилага конкурентно таксол спрямо NCI-H226 и NCI-H23 NSCL клетъчните линии и доксорубицин спрямо RHI туморна клетъчна линия на рабдомиосаркома.

### Пример 5

#### **Взаимодействие между ET-743 и други антинеопластични агенти**

Въпреки че ET-743 се прилага в клинични опити върху рак при човека, механизмите на антитуморната активност на ET-743 не са напълно изяснени. Целта на настоящото изследване е, да се прецени природата на взаимодействието между ET-743 и други антинеопластични агенти (доксорубицин; DXR, триметрексат; TMTX и пакситаксел; таксол), прилагани в индексния (CI) метод на Chou-Talalay. За по-добро изясняване на клиничното приложение на ET-743, при настоящото изследване се използва SRB анализи за определяне на цитотоксичността, която е следствие на комбинирането на ET-743 с три други антинеопластични агента при администриране в две клетъчни линии на саркома на меките тъкани, HT-1080 и HS-18, *in vitro*. Доксорубицинът е единствен агент, който води до независим от последователността синергизъм, когато се комбинира с ET-743. Конкурентното



прилагане на ET-743 и доксорубицин води до синергични взаимодействия в двете клетъчни линии.

Индексът на комбиниране CI (средно) е 0.86, 0.83, 0.84 и 0.85 съответно за 50, 75, 90 и 95% умъртвяване на клетки в HT-1080 клетки и 0.89, 0.74, 0.64 и 0.60 съответно за 50, 75, 90 и 95% умъртвяване на клетки в HS-18 клетки. Прилагане на ET-743 в продължение на 24 часа преди доксорубицина е най-ефективния режим спрямо двете клетъчни линии; това води до много нисък индекс на комбиниране CI на до около 90% ниво на умъртвяване на клетки за двете клетъчни линии. Прилагане на таксол преди ET-743 също е ефективен режим. Тези резултати показват, че в клиничните опити при лечение на саркома на меките тъкани трябва да се използва комбинацията на ET-743 и доксорубицин.

## **Материали и методи**

### Химикали

ET-743 се доставя от Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, Madrid, Spain) и се получава като 2 mM изходен разтвор в диметилсулфоксид. Паклитаксел и доксорубицин се доставят от Sigma chemical Co. (St. Louis, MO). Триметрексат TMTX се доставя от Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich).

### Клетъчна култура

Клетъчните линии на саркома на меките тъкани, HT-1080 и HS-18, се държат като многослойни култури в RP<I-1640, съдържаща 10% ембрионален волски серум.

### SRB анализ за цитотоксичност

Цитотоксичността към лекарства се определя посредством SRB анализ за цитотоксичност, провеждан в описаните по-горе микротитърни плочки с 96 гнезда. Клетките се поставят в дублирани гнезда (5000 клетки/гнездо) и се излагат на въздействието на лекарства в различни концентрации. Клетките се

фиксираат с 50% TCA разтвор в продължение на 1 час и към всяко гнездо се прибавя 0.4% SRB (Sigma). След инкубиране в продължение на 30 минути, плочката се промива с 1% оцетна киселина и се отчитат 570 nm с помощта на Biowhitaker записвач 2001. Гнездата с клетки, несъдържащи лекарства, и тези, със среда плюс лекарства, но без клетки, се използват, съответно, за положителен и отрицателен контрол.

#### Конкурентно прилагане на ET-743 и доксорубин, триметрексат или паклитаксел

Клетките се посаждат в плочки с 96 гнезда, както е описано по-горе. Клетките се третират със смеси със седем различни концентрации на единични лекарства или комбинации при молно съотношение 1:100 (ET-743:други лекарства). След въздействие на лекарствата в продължение на 72 часа се измерва подтискането на растежа посредством SRB анализ.

#### Последователно прилагане на ET-743 и доксорубин, триметрексат или паклитаксел

При използване на експерименталното разработване, описано по-горе, клетките се подлагат на действието на три различни концентрации лекарства, които представят  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$ , съответно на ET-743 и доксорубин, триметрексат или паклитаксел. След предварително третиране в продължение на 24 часа с ET-743 или с комбинирано лекарство, към съответните гнезда се прибавят вторите лекарства в продължение на 48 часа. Подтискането на растежа се определя посредством SRB анализ.

#### Клетъчен цикличен анализ

Експоненциално порасналите клетки се третират със или без лекарства в продължение на няколко часа. След това клетките се събират и се фиксираат с леденостуден 70% метанол. Деооксирибонуклеиновата киселина се оцветява с

пропидиев йодид, както е описано преди. Десет хиляди оцветени клетки се анализират с помощта на Becton Dickinson флуоресцентно-активиран клетъчен сортировач (FACS).

### Определяне на синергизъм и антагонизъм и конструиране на изоболограми

Индексът на комбиниране CI се изчислява по уравнението на Chou-Talalay, при което се взима пред вид както потенциала ( $D_m$  или  $IC_{50}$ ), така и формата на кривата на дозичния ефект (стойността на  $m$ ). Общото уравнение на класическата изоболограма ( $CI=1$ ) е:

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

където  $(Dx)_1$  и  $(Dx)_2$  в знаменателите са дозите (или концентрациите) за  $D_1$  (ET-743) и  $D_2$  (друго лекарство) самостоятелно, които дават X% инхибиране, при което  $(D)_1$  и  $(D)_2$  в числителите са дози на ET-743 и друго лекарство в комбинация, които също подтискат X% (т.е. изоефективни).  $CI < 1$ ,  $CI = 1$ ,  $CI > 1$  показват съответно, синергизъм, адитивен ефект и антагонизъм.

$(Dx)_1$  и  $(Dx)_2$  могат лесно да бъдат изчислени от уравнението за среден ефект на Chou и Chou et al.:

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

където  $Dm$  е средната доза, която се получава от антилогаритъма на X-пресечната точка на кривата, в графиката на X-log (D) спрямо Y-log [fa / (1 - fa)] или  $Dm = 10^{(Y\text{-пресечната точка}) / m}$  и  $m$  е наклона на кривата. С компютърна програма на Chou и Chou могат автоматично да бъдат изчислени стойностите на  $m$ ,  $Dm$ ,  $Dx$  и  $CI$ . От  $(Dm)_1$ ,  $(Dx)_2$ , и  $D_1 + D_2$ , лесно се конструират изоболограми на базата на уравнение (A).

За изоболограми на два агента, към уравнение (A) се прибавя трети член

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

За простота, третият член обикновено се пропуска и така се получава класическа изоболограма. В Резултат 2 и 3 са дадени стойностите на  $CI$ , получени при класическото изчисление.

**Резултат 1****Цитотоксичност на четири лекарства спрямо HT-1080 и HS-18**IC<sub>50</sub> за човешки клетки на саркома на меки тъкани

|              |      | HT-1080 | HS-18 |
|--------------|------|---------|-------|
| ET-743       | (nm) | 0.01    | 0.27  |
| Доксорубицин | (nm) | 25      | 225   |
| Триметрексат | (nm) | 6       | 70000 |
| Паклитаксел  | (nm) | 1.3     | 10    |

Тази таблица показва, че и двете клетъчни линии HT-1080 и HS-18 са по-чувствителни към ET-743 от други антинеопластични агенти.

**Ефект на всеки агент върху клетъчното циклично разпределение спрямо HS-18 клетки****24 часа и 72 часа след третиране с приблизителна IC<sub>50</sub> доза**

| Лекарства    | Доза   | Час | %G1  | %S фаза | %G2M |
|--------------|--------|-----|------|---------|------|
| Контрола     |        |     | 76.3 | 11.2    | 12.5 |
| ET-743       | 270 pM | 24  | 32.4 | 47.6    | 20.0 |
|              |        | 72  | 86.7 | 8.4     | 4.9  |
| Доксорубицин | 225 nm | 24  | 10.1 | 64.9    | 25.0 |
|              |        | 72  | 1.3  | 63.8    | 34.9 |
| Триметрексат | 70 uM  | 24  | 44.2 | 53.8    | 1.9  |
|              |        | 72  | 35.5 | 57.6    | 7.0  |
| Паклитаксел  | 10 nm  | 24  | 32.8 | 52.5    | 15.5 |
|              |        | 72  | 23.5 | 58.7    | 26.2 |

**Ефект на всеки агент върху клетъчното циклично разпределение спрямо HT-1080 клетки****24 часа и 72 часа след третиране с приблизителна IC<sub>50</sub> доза**

2025.03

| Лекарства    | Доза   | Час | %G1  | %S фаза | %G2M |
|--------------|--------|-----|------|---------|------|
| Контрола     |        |     | 47.5 | 35.8    | 16.7 |
| ET-743       | 10 pM  | 24  | 42.6 | 36.1    | 21.3 |
|              |        | 72  | 83.1 | 10.2    | 6.7  |
| Доксорубицин | 25 nM  | 24  | 36.1 | 17.5    | 46.4 |
|              |        | 72  | 46.2 | 5.3     | 48.5 |
| Триметрексат | 6 nM   | 24  | 31.9 | 56.8    | 11.3 |
|              |        | 72  | 32.0 | 53.7    | 14.4 |
| Паклитаксел  | 1.3 nM | 24  | 45.4 | 37.3    | 17.3 |
|              |        | 72  | 86.0 | 9.0     | 5.0  |

Резултат 2 показва CI съответно за HT-1080 и HS-18 клетките, на които едновременно се прилагат ET-743 и едно от антинеопластичните лекарства, като доксорубицин, триметрексат или паклитаксел в молно съотношение на комбинираната смес от 1 до 100. Когато клетките се третират с ET-743 и доксорубицин, всички стойности на CI са по-малки от 1, което показва синергичен ефект и в двете клетъчни линии. CI (средна стойност) с тази схема е 0.86, 0.83, 0.84 и 0.85, съответно при 50, 75, 90 и 95% умъртвяване на клетки в HT-1080 и 0.89, 0.74, 0.64 и 0.60, съответно при 50, 75, 90 и 95% умъртвяване на клетки в HS-18. Този резултат показва, че при конкурентното лечение на с ET-743 и доксорубицин се получава синергичен цитотоксичен ефект. Обратно, когато клетките се третират с ET-743 и триметрексат или паклитаксел, се наблюдава антагонистичен цитотоксичен ефект.

Построява се графика на CI за двете клетъчни линии, на които първоначално се прилага ET-743 в продължение на 24 часа, последван от доксорубицин в продължение на 48 часа. И в двете клетъчни линии, лечението с ET-743, последван от доксорубицин, показва синергичен цитотоксичен ефект, стойността на CI за HT-1080 при 80% ниво на умъртвени клетки е  $0.64 \pm 0.12$  и стойността на CI за HS-18 при 88% ниво на умъртвени клетки е  $0.24 \pm 0.06$ . Обратно, лечението с доксорубицин, последван от ET-743 (Резултат 3а, по-

долната фигура) показва на пръв поглед добра стойност на CI, обаче, стойността на CI за HT-1080 при 80% ниво на умъртвени клетки е  $1.00 \pm 0.03$ , което показва, че ефектът на двата агента е адитивен, и CI при най-високата степен на умъртвяване е с по-лоша стойност, отколкото при средна степен на умъртвяване, и за двете клетъчни линии.

Когато клетките се третират с ET-743, последван от триметрексат, стойностите на CI за HT-1080 са близки до единица или над нея, което показва, че ефектът на двата агента е антагонистичен или адитивен. Обратно, всички тези стойности за HS-18 са под 0.6, което показва, че двете лекарства имат синергично действие. Когато клетките се третират с триметрексат, последван от ET-743 се наблюдава адитивен ефект и за двете HT-1080 и HS-18 клетъчни линии.

При прилагане на паклитаксел, последван от ET-743 се наблюдава синергичен цитотоксичен ефект. Когато клетките се третират с паклитаксел, последван от ET-743, стойността на CI за HT-1080 при 89% ниво на умъртвени клетки е  $0.92 \pm 0.06$  и стойността на CI за HS-18 при 78% ниво на умъртвени клетки е  $0.38 \pm 0.13$ .

### Резюме

ET-743 е силно активен спрямо клетки на саркома на меки тъкани при човек, особено спрямо клетъчна линия HT-1080 на злокачествена фибросаркома.

Когато се комбинира с ET-743, доксорубицинът показва независим от последователността на прилагане синергизъм, обаче, прилагането на ET-743, последван от доксорубицин е по-ефективно по отношение и на двете клетъчни линии.

Прилагането на паклитаксел, последван от ET-743, също е ефективна схема спрямо клетки на саркома на меки тъкани при човек, докато едновременното им прилагане е антагонистично.



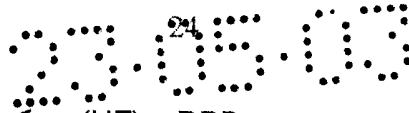
### Пример 6

#### ***In vivo* комбинации на химиотерапевтични агенти с ектеинасцидин 743 (ET-743) спрямо твърди тумори**

За ET-743 са описани няколко уникални механизма на действие, включително свързване към минимални вдлъбнатини на деоксирибонуклеиновата киселина, алкилиране на азота на гуанина, транскрибиращо потискане на MDR1 гена (Jin et al., PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo et al., PNAS 97, 6780, 2000) и противодействие на действието на нуклеарния рецептор SXR (Synold et al., Nature Med. 7, 584, 2001). Като самостоятелен агент, ET-743 инхибира *in vivo* туморния растеж като се постига пълна ремисия (CR) по отношение на някои човешки туморни щамове (Hendriks et al., Ann. Oncol. 10, 1233, 1999) включващи меланома (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), карцином на яйчник (HOC 22) и гърда (MX-1). Ефективността на ET-743 в комбинация с лекарства, които работят по редуващи се механизми, може да доведе до възможност за понижаване на токсичността на лекарството или до засилване на ефективността на лекарството при резистентен или рецидивиращ рак.

За тази цел, няколко агента, включително доксорубицин (DOX; 8 mg/kg), цис-платина (DDP; 12 mg/kg) и винбластин (VINB; 6 mg/kg) се администрират преди/след ET-743 (0.2 mg/kg) при еднoчасовo предварително третиране, qdx5, върху един или повече от следните тумори: хондросаркома (CSHA), остеосаркома (OSA-FH), фибросаркома (SW684), тумор на яйчник (MRI-H-1834), NSCL (LX-1) и тумор на бъбрек (MRI-H-121) при дефинирана активност <50% T/C. При модел на кухи фибри (HF), последователността на прилагане на доксорубицин 1 час след ET-743 е значително по-ефективна, от самостоятелното прилагане на ET-743 в хондросаркома (6% спрямо 10%), фибросаркома (33% спрямо 48%) и остеосаркома (20% спрямо 34%). При остеосаркома ксенографти се получават същите резултати от 17% спрямо 43%.





Изследванията на кухите фибри (HF) с DDP показват, че прилагането на ET-743 след DDP е по-ефективно от самостоятелното прилагане на ET-743 при рак на яйчник (28% спрямо 100%) и хондросаркома (15% спрямо 19%) и еквивалентно действие при остеосаркома (36% T/C). Данните за ксенографта потвърждават последователността на прилагане на ET-743 след DDP като по-ефективна от самостоятелното прилагане на ET-743 (35% спрямо 66%). Изключение прави NSCL, при който самостоятелното прилагане на ET-743 не е активно (62% T/C), но при DPP, последван от ET-743, се получава CR (<1% T/C). При реналните ксенографти, самостоятелното прилагане на ET-743 е много активно (22% T/C), но при прилагането на ET-743, последвано от винбластин, също се постига пълна ремисия (CR) (<1% T/C). Правят се отделни изследвания с други стандартни агенти в туморни ксенографти на гърда, бъбрек, меланома и стомах.

### Пример 7

#### **Предклинична активност и биоразпределение на комбинации на ектеинасцидин (ET-743) и доксорубицин (DOX) при човешка рабдомиосаркома**

ET-743 е първият от нов клас антитуморни средства, които показват антитуморна активност. ET-743 показва активност при пациенти със саркома, която не се поддава на лечение с доксорубицин и ифосфамид. От гледна точка на потенциала му като ефективно лекарство, ние сме изследвали (1) предклиничната антитуморна активност на комбинацията ET-743/доксорубицин спрямо човешката рабдомиосаркома TE 671 и (2) възможните взаимодействия между лекарствата и тяхното биоразпределение в голи мишки и туморни ксенографти.



*In vitro*: Ефектът на всяко лекарство или комбинация 1 час след прилагане се преценява посредством клоногенен анализ. Самостоятелното прилагане на ET-743 или доксорубицин показва антитуморна активност спрямо TE 671 клетки. Комбинацията, съгласно изоболограмния анализ и индекса на комбинация, е поне адитивна в някои туморни клетъчни линии, включително TE 671.

*In vivo*: Когато ксенографтните тумори достигнат тегло приблизително 100 mg, в голи мишки еднократно интравенозно се администрират ET-743 (0.1 mg/kg) и доксорубицин (10 mg/kg). Стойностите на понижаване на теглото на тумора/Log10 клетъчно умъртвяване са: 46%/0.132 за ET-743, 50%/0.33 за доксорубицин, 77%/0.924 за едновременно прилагане на ET-743 и доксорубицин, 82%/1.12 за комбинация на ET-743, администриран 1 час преди доксорубицина и 75%/0.85, когато ET-743 се администрира 1 час след доксорубицина. Наблюдава се, също така, синергичен ефект по отношение на мишата фибросаркома UV2237 и по отношение на подлинията UV2237/ADR, резистентна на множество лекарства.

Тези данни показват синергичен ефект на комбинацията ET-743 и доксорубицин, който изглежда е независим от последователността на лекарствата или комбинацията в изследваните случаи. Нито концентрациите на доксорубицин в плазмата, нито концентрациите на доксорубицин в тумора се различават значително, когато доксорубицинът се прилага самостоятелно или в комбинация с ET-743. Изучава се фармакокинетичната (PK) преценка на ET-743, прилаган самостоятелно или в комбинация с доксорубицин. Комбинацията на ET-743 с доксорубицин изглежда адитивна *in vitro* и синергична *in vivo* при рабдомиосаркома TE 671. Фармакокинетичният профил на доксорубицина не се влияе от съпътстващото третиране с ET-743. Тези данни са рационални за използване на тази комбинация при ранни клинични опити.



### Пример 8

ET-743 и цис-платина показват *in vitro* и *in vivo* синергизъм по отношение на клетъчни линии на човешка саркома и карцином на яйчник

В настоящото изобретение е установено, че ET-743 подобрява активността на цис-платината *in vitro* и *in vivo*. При някои ракови клетъчни линии, включващи човешки чревен карцином (HCT116), карцином на яйчник (Igrov-1/A2780), техни резистентни подлинии (съответно, Igrov-1/PSC-ET и 1A9) и рабдомиокарцинома (TE671), прилаганите по-ниски концентрации на ET-743, използван самостоятелно, засилват активността на цис-платината поне два пъти. При концентрации, съответстващи на IC30/IC50 на ET-743, се получават или адитивни, или синергични ефекти. Тези резултати водят до *in vivo* изследвания при използване на ксенографтни модели за изучаване на ефективните лекарствени комбинации с ET-743.

В подкожно трансплантирани клетки TE671, частично чувствителни или към ET-743 или към цис-платина, при комбинацията от двете лекарства се получава много по-голям антитуморен ефект от този, постигнат при използването на всяко лекарство в съответните му MTD нива. Яйчниковият 1A9 тумор, който обикновено е резистентен и към ET-743 и към цис-платина като самостоятелни агенти, при използване на комбинации, подтискането на туморния растеж е по-голямо от 50%. Ортолокално трансплантиран карцином на яйчник при човек HOC8, продуциращ туморни възелчета в перитонеалната кухина с асцитис, който е резистентен и към ET-743 и частично чувствителен към цис-платина, в комбинация се получава драматично повишаване на оживяването, даже при доза ET-743 от 0.05 mg/kg (1/4 MTD) и не се причинява значителна токсичност. Доза ET-743 от 0.15 mg/kg забележимо повишава оживяването, но има, също така, и повишение на токсичността, показано



посредством загубата на топло, която е значително по-висока от тази, наблюдавана след третиране с всяко лекарство поотделно.

Установените факти позволяват ясно да се конструират клиничните опити при използване на комбинация от ET-743 и цис-платина в саркоми и рак на яйчниците. *In vitro* и *in vivo* изследванията са в прогрес на изясняване на механизмите, подчертаващи синергизма между от ET-743 и цис-платината в тези видове рак.

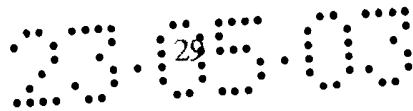
### Пример 9

**Висока доза дексаметазон (dex) предпазва от хепатотоксичност на ектеинасцидин 743 (ET-743) при плъхове**

ET-743, агент, получен от морско водорасло, понастоящем е във фаза II на клиничните опити. Той показва клинична активност спрямо саркоми, а предварителните данни показват активност спрямо карциноми на гърда и яйчник. Обаче, в повечето третирани пациенти се проявява хепатотоксичност, характеризирана с обратим трансаминитис, а в останалите пациенти се появява холестазис. В най-чувствителния от животинските видове, плъха, токсичността на ET-743 се характеризира с чернодробна некроза и възпаление на жлъчния канал. В светлината на противовъзпалителната активност на дексаметазона, установено е неговото действие върху увреждането на черния дроб, индуцирано от ET-743, при плъхове. Женски Wistar плъхове получават единична интравенозна доза ET-743 от 40 µg/kg. Някои плъхове предварително се третират с единична орална доза дексаметазон при 1, 5, 10 или 20 mg/kg 24 часа преди третирането с ET-743. До 3 дни след администрирането на ET-743 се оценяват чернодробната патология и плазмените концентрации на алкална фосфатаза (ALP), аспартат аминотрансфераза (GOT) и общ билирубин (TB). Конвенционални хистологични срезове на черния дроб са изследвани с помощта на оптична микроскопия.

Два дни след третирането с ET-743, черните дробове на плъховете, които са третирани само с ET-743, показват възпаление на жлъчния канал, поразителни дегенеративни промени в жлъчните епителни клетки и зони на чернодробна некроза. Плазмените нива на алкална фосфатаза (ALP) и аспартат аминотрансфераза (GOT) значително се повишават след два дни. Холестазиcът се проявява в драматично повишение на плазмените концентрации на общ билирубин (TB), което започва на втория ден след третирането с ET-743. Индуцираните от ET-743 хистопатологични промени и повишаване на плазмените нива на алкална фосфатаза (ALP), аспартат аминотрансфераза (GOT) и общ билирубин (TB) тотално се анулират в плъхове, предварително третирани с 10 или 20 mg/kg дексаметазон.

Докато при 1 mg/kg дексаметазон се наблюдава ниска защита, 5 mg/kg дексаметазон защитават умерено. Плазмените нива на ET-743 в плъховете, които са получавали 50 mg/kg дексаметазон дневно в продължение на 3 дни преди ET-743, не се понижават в сравнение с тези в плъхове, приели само ET-743. Още повече, активността на ET-743 спрямо B16 меланома, имплантирана в мишки, не се възпрепятства от дексаметазона. Следователно, схемата на прибавяне на висока доза дексаметазон към ET-743 може облекчава хепатотоксичността при болните от рак пациенти.



## ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Приложение на ET-743 в състав за медикамент за ефективно лечение на тумор посредством комбинирана терапия, характеризиращо се с това, че ET-743 се използва заедно с друго лекарство.
2. Приложение на лекарство в състав за медикамент за ефективно лечение на тумор посредством комбинирана терапия, характеризиращо се с това, че лекарството се използва заедно с ET-743.
3. Приложение, съгласно претенции 1 или 2, характеризиращо се с това, че комбинацията на ET-743 и лекарството е синергична.
4. Приложение, съгласно претенции 1, 2 или 3, характеризиращо се с това, че ET-743 може да бъде част от същия медикамент или да се прилага като отделен медикамент за администриране по същото време или по друго време, различно от това на лекарството.
5. Приложение, съгласно коя да е от предишните претенции, характеризиращо се с това, че при комбинираната терапия се прилагат ET-743 и антрациклин.
6. Приложение, съгласно претенция 5, характеризиращо се с това, че при комбинираната терапия се прилагат ET-743 и доксорубицин.
7. Приложение, съгласно коя да е от претенции от 1 до 4, характеризиращо се с това, че при комбинираната терапия се прилагат ET-743 и платиново антитуморно съединение.
8. Приложение, съгласно претенция 7, характеризиращо се с това, че при комбинираната терапия се прилагат ET-743 и цис-платина.
9. Приложение, съгласно коя да е от предишните претенции, характеризиращо се с това, че при комбинираната терапия се прилагат ET-743 и дексаметазон.
10. ET-743 и антитуморно лекарство, характеризиращо се с това, че е синергично с ET-743 при администриране върху пациент с тумор.