



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83500 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/7088

A61K 31/337

A61K 31/17

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/665

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ДЕФІБРОТИДУ ЯК ПРОТИПУХЛИННОГО АГЕНТА САМОСТІЙНО АБО В ПОЄДНАННІ З ІНШИМИ ПРОТИПУХЛИННИМИ АГЕНТАМИ

1

2

(21) a200602374

(22) 27.08.2004

(86) PCT/EP2004/009723, 27.08.2004

(31) 60/539,344

(32) 28.01.2004

(33) US

(31) MI2003A001714

(32) 05.09.2003

(33) IT

(46) 25.07.2008, Бюл.№ 14, 2008 р.

(72) ФЕРРО ЛАУРА ІРІС, ІТ/ІТ, ЯКОБЕЛЛІ МАССІМО, ІТ/ІТ, РІЧАРДСОН ПОЛ, US/US

(73) ДЖЕНТІУМ СПА

(56) US 2003/0013669 A1, 16.01.2003

EISSNER GUENTHER ET AL: "Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: Protective effect of defibrotide" BLOOD, vol. 100, no. 1, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 334-340, XP002309320

(57) 1. Застосування дефібротиду для виготовлення фармацевтичної композиції з протипухлинною дією.

2. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що дефібротид використовують у поєднанні з принаймні іншим активним інгредієнтом з протипухлинною дією.

3. Застосування за п. 2, яке відрізняється тим, що згаданий інший активний інгредієнт з протипухлинною дією вибраний з паклітакселу, монокроталіну, BCNU, мелфалану і/або циклофосфаміду.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, яке відрізняється тим, що фармацевтичну композицію вводять ссавцеві, переважно людині.

5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що згаданий ссавець уражений множинною мієломою.

6. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що згаданий ссавець уражений карциномою молочної залози.

7. Застосування за будь-яким з пп. 1-6, яке відрізняється тим, що дефібротид вводять внутрішньовенно.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, яке відрізняється тим, що згаданим ссавцем є людина.

9. Спосіб лікування ссавця, ураженого пухлиною, який полягає в тому, що ссавцеві вводять ефективну кількість дефібротиду.

10. Спосіб за п. 9, який відрізняється тим, що дефібротид вводять в поєднанні з принаймні іншим активним інгредієнтом з протипухлинною дією.

11. Спосіб за п. 10, який відрізняється тим, що згаданий інший активний інгредієнт з протипухлинною дією вибраний з паклітакселу, монокроталіну, BCNU, мелфалану і/або циклофосфаміду.

12. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який відрізняється тим, що згаданим ссавцем є людина.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який відрізняється тим, що згаданий ссавець уражений множинною мієломою.

14. Спосіб за будь-яким з пп. 9-11, який відрізняється тим, що згаданий ссавець уражений карциномою молочної залози.

15. Спосіб за будь-яким з пп. 9-14, який відрізняється тим, що дефібротид вводять внутрішньовенно.

Об'єктом даного винаходу є спосіб лікування ссавця, ураженого пухлиною, шляхом введення

згаданому ссавцеві ефективної кількості дефібротиду.

(13) C2

(11) 83500

(19) UA

Обґрунтування винаходу

Термін дефібротид (далі ДФ) звичайно означає полідезоксирібонуклеотид, якого одержують шляхом екстрагування із тканин тварини і/або рослини [1, 2]; полідезоксирібонуклеотид звичайно використовують у формі солі лужного металу, зазвичай натрієвої солі, і зазвичай він має молекулярну вагу приблизно 45-50кДа (кілодальтон) (реєстраційний номер CAS: 83712-60-1).

ДФ використовують головним чином завдяки його протитромбозній активності [3], хоча його можна використовувати в інших застосуваннях, таких як, наприклад, лікування гострої ниркової недостатності [4] і лікування гострої ішемії міокарда [5]. ДФ також використовують в лікуванні критичних клінічних умов, наприклад, для пригнічення токсичності, пов'язаної з високими дозами режимів хіміотерапії, зокрема, синдрому гепатичного закупорювання вен [10, 11]; показано, що ДФ має захисну дію відносно запрограмованої смерті клітини, спричиненої флударабіном, і відносно аллоактивації клітин ендотелію та епітелію, також без зміни протилежних ефектів флударабіну [12]; існують також попередні клінічні дані про захисні ефекти ДФ, які були досягнуті в моделі руйнування ендотелію, опосередкованого ліпополісахаридом [13].

Спосіб виготовлення ДФ, який може виробляти продукт, який має однорідні і добре визначені фізико-хімічні характеристики і який є також вільним від можливих не бажаних побічних ефектів, описаний в патентах США [6, 7].

В наступному дослідженні ДФ був вивчений в поєднанні з антибластичними цитотоксичними агентами в моделі клітин карциноми молочної залози миші ЕМТ-6 і в ендотеліальних клітинах корови, в культурах клітини і в експериментальній моделі, в якій були використані пацюки, що мають пухлини, піддані дії високих доз хіміотерапії.

Діяння ДФ при концентрації 50мкг/мл або перед і під час, або під час та після дії на клітини карциноми молочної залози миші ЕМТ-6 в культурі з 4-гідропероксицикло-фосфамідом (4НС) значно збільшує цитотоксичність 4НС до ступеню подорожжя інкременту (приросту) приблизно на 2 логарифмічні одиниці у вбиванні клітин пухлини при концентрації 4НС, що становить від 50 до 250 мкмоль (див. фігура 1). Діяння ДФ при концентрації 50мкг/мл також призводить до збільшення цитотоксичності тіотету з чіткою відмінністю, базованою на способі діяння. Зокрема, діяння ДФ на клітини ЕМТ-6 перед і під час діяння тіотету збільшує цитотоксичність відносно клітин пухлини на дві логарифмічні одиниці для концентрації тіотету від 100 до 250мкмоль. Цікавими даними, які виникають, є те, що діяння ДФ на клітини ЕМТ-6 під час і після діяння тіотету призводить до збільшення цитотоксичності, хоча до меншого ступеню, показуючи збільшення від 0,5 до 1 логарифмічної одиниці в цитотоксичності тіотету. Подібний результат спостерігався з карбоплатином; однак, діяння ДФ перед і під час або під час і після діяння мелфалану не показує ніякого значного впливу на циклотоксичність мелфалану відносно клітин карциноми молочної залози миші ЕМТ-6 в культурі. З іншого боку, хоча було продемонстровано, що цитотоксичність цих протибластичних алкілованих агентів (АА) самостійно відносно ендотеліальних клітин корови в культурі була подібною до такої, що спостерігалась в клітинах карциноми молочної залози ЕМТ-6, не було показано ніякого збільшення цитотоксичності, коли цей тип моделі культури клітини був підданий дії АА в поєднанні з ДФ при концентрації 50мкг/мл.

Гепатотоксин монокроталін і АА кармусти (BCNU), самостійно або в поєднанні з ДФ, були випробувані in vivo в експериментальній моделі, яка використовувала пацюків, уражених карциномою молочної залози 13762. В цій експериментальній моделі не було показано жодної додаткової токсичності у тварин, коли вони були піддані дії цих агентів разом з ДФ, але спостерігалась значна зупинка зростання пухлини (TGD) (дивись таблицю 1 та фігури 2а та 2b).

Таблиця 1. Зупинка зростання пухлини у пацюків, уражених карциномою молочної залози 13762, після лікування монокроталіном або BCNU самостійно або в поєднанні з дефібротидом (ДФ). Пухлина була імплантована в день 0, і хіміотерапія була призначена на день 8 та день 18.

Група лікування	Дні до досягнення 500мм ³	TGD (дні)	ρ значення
Контроль	14,6±0,8	-	-
Монокроталін (мг/кг) в.п. дні 8 та 18	15,6±1,0	1,0	0,435
ДФ (200мг/кг) в.в. двічі на день, дні 8-26, + монокроталін	16,1±0,6	1,5	0,134
ДФ (200мг/кг) в.в. двічі на день, дні 10-26, + монокроталін	18,2±1,5	3,6	0,034
BCNU (150мг/кг) в.п. дні 8 та 18	18,0±2,5	3,4	0,195
ДФ (200мг/кг) в.в. двічі на день, дні 8-26 +BCNU	19,7±1,5	5,1	0,003
ДФ (200мг/кг) в.в. двічі на день, дні 10-26 + BCNU	21,3±1,6	6,7	0,0002

Ці дослідження були відтворені з використанням монокроталіну, BCNU та циклофосфаміду (CTX), самостійно або в поєднанні з ДФ, в одній і тій же експериментальній моделі. Порівняно з контролем, значна затримка зростання пухлини (TGD) спостерігалась при використанні одного лише ДФ (p<0,05); ця затримка була, зокрема, значною, коли ДФ поєднували з CTX та BCNU (p<0,04) і була

помітно більшою, ніж та, яку одержували при індивідуальному використанні кожного агента. Несподівано, коли використовували лише один ДФ, спочатку він затримує зростання пухлини, але потім зростання пухлини знову стає нормальним. Крім того, коли ДФ використовували в поєднанні з АА, підростання пухлини стає швидким, як тільки сумісне введення ДФ припинилось. Ці дані показують

не тільки додатковий протипухлинний ефект ДФ, але також пряму антибластичну активність самого ДФ.

Зменшення зростання пухлини (TGD) і кількості легеневих метастаз також спостерігали у миші, ураженої карциномою легень Леві, коли ДФ додавали до лікування паклітакселом, незалежно від того, було чи не було воно пов'язане з карбоплатином, і в порівнянні з однією лише цитотоксичною терапією, але без виявлення очевидного збільшення токсичності (дані не представлені). Механізм, який лежить в основі цих ефектів, залишається без пояснення, але можливо, що включені протиадгезивні властивості ДФ, що дає роль адгезії клітини в механізмі, включеному у стійкість медичного препарату [8, 9].

Було також досліджено, чи має ДФ *in vivo* активність в мишачій моделі людської множинної мієломи (ММ). Шістдесят мишей SCID/NOD чоловічої статі (віком 6-8 тижнів) були піддані дії радіації (450рад) і через 24 години після цього піддані ін'єкції s.c. 5×10^6 ММ-1S клітин ММ людини. При утворенні помітних пухлин миші були навмання поділені на 6 груп (по 10 мишей в кожній), які одержували: а) розчинник; б) ДФ (в.в. 450мг/кг двічі на день.); с) мелфалан (MEL) 2,5мг/кг в.п. (внутрішньо перитонально) один раз на тиждень; d) циклофосфамід (CTX) 50мг/кг в.п., в дні 8, 10, 12, 20, 22 та 24; е) та f) поєднання ДФ (300мг/кг в.в.) з MEL або CTX, відповідно. За мишами спостерігали q3 днів відносно ваги тіла, потенційної токсичності і об'єму пухлини на основі даних електронного пристрою для вимірювання каверн.

ДФ, як одиничний агент або в поєднанні з MEL чи CTX, був добре толерантним без геморагічних ускладнень або втрати ваги тіла ($P > 0,05$) у всіх групах. Головними кінцевими пунктами ефективності були а) зміна об'єму пухлини і б) загальне виживання (час до загибелі, яка відбувається, коли діаметр пухлини становить > 2 см). Лікування ДФ призводить до значно менших значень об'ємів пухлини, ніж у контрольної миші ($P < 0,05$ для всіх порівнянь шляхом аналізу варіацій (дисперсії) і випробувань після розтину); в поєднанні з MEL або CTX він спричиняє значно менші об'єми пухлини, ніж відповідна цитотоксична хімотерапія одиничним агентом ($P < 0,05$ для всіх порівнянь).

Аналіз виживання за Kaplan-Meier показав, що уведення ДФ як одиничного агента або в поєднанні з цитотоксичною хімотерапією (MEL або CTX) було пов'язане зі статистично значимим подовженням загального виживання порівняно з контрольною групою, яку лікували розчинником, або з групами, яких лікували за допомогою MEL або CTX, відповідно ($P < 0,001$ для всіх порівнянь, випробування ступеню логарифма). Цікаво, що дослідження *in vitro* не показали значного прямого *in vitro* цитотоксичного ефекту ДФ проти клітин ММ, пропонуючи, що активність, яка спостерігається *in vivo*, може бути завдяки ефекту (ефектам) взаємодії клітин ММ з їх локальним мікро середовищем.

Ці обнадійливі результати демонструють, що ДФ не дає захисту пухлини в цій моделі ММ хімотерапії і створює перше підтвердження принципу, що ДФ не тільки має *in vivo* протипухлинну актив-

ність проти ММ, але також підвищує відгук (реакцію) до цитотоксичного лікування. Це дослідження показує, що проти-ММ активність ДФ можлива завдяки його впливу на взаємодію клітини ММ з її мікро середовищем, і забезпечує основу для майбутніх клінічних випробувань ДФ в поєднанні з іншими агентами для лікування ММ та інших неоплазій.

Тому спосіб лікування ссавця, ураженого пухлиною, переважно людини, шляхом уведення ефективної кількості ДФ є об'єктом даного винаходу. ДФ може бути уведений в поєднанні з принаймні іншим активним інгредієнтом з протипухлинною дією. Інший активний інгредієнт з протипухлинною дією може бути вибраний серед паклітакселу, монокроталіну, BCNU, мелфалану і/або циклофосфаміду.

Інші об'єкти винаходу представлені рецептурами, які містять ДФ і принаймні один інший інгредієнт з протипухлинною дією; рецептури можуть бути переважно у формі водних розчинів і, навіть краще, зручні для внутрішньовенного уведення, і можуть містити ексципієнти і допоміжні засоби, відомі спеціалістам даної галузі.

Для цілей даного винаходу термін дефібротид (ДФ) можна, таким чином, розуміти як будь-який олігонуклеотид і/або полінуклеотид, одержаний екстрагуванням із тваринних і/або рослинних тканин, зокрема, із органів ссавців. Переважно ДФ можна виготовляти відповідно до способу, описаного в патентах США (6, 7), які включені тут шляхом посилань.

Бібліографія:

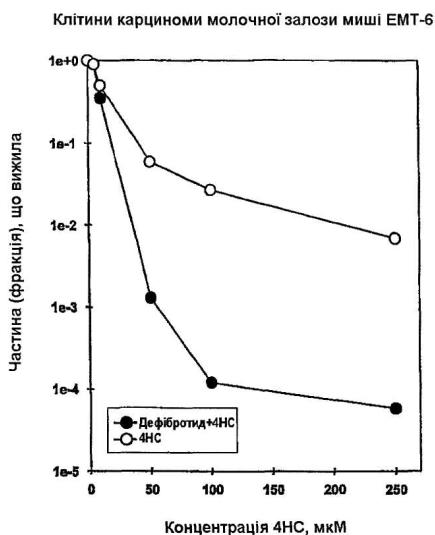
1. США-3 770 720
2. США-3 899 481
3. США - 3 829 567
4. США-4 694 134
5. США - 4 693 995
6. США-4 985 552
7. США - 5 223 609
8. Carlo-Stella, C, Di Nicola, M., Magni M., та ін., Дефібротид в поєднанні з гранулоцит Колоні-стимулюючим фактором значно підвищує мобілізацію первісних та активних периферичних клітин крові предків у миші. Дослідження раку, 2002, 62: 6152-6157 (листопад 1, 2002).
9. Hazlehurst, L, Damiano, J., Buyuksal, I., Pledger, W., Dalton, W.S., Адгезія до фібронектину через Ы інтеріни регулює рівні p27 виростку 1 і вносить свій вклад до адгезії клітини, яка опосередковує стійкість ліків (CAM-DR). Онкоген, 2000; 19: 4319-4327.
10. Richardson, P.G., Elias, A.D., Krishnan, A., та ін. Лікування важкого захворювання закупорки вен дефібротидом: співчутливе використання результатів з відгуком (реакцією) без значної токсичності в популяції з високим ризиком. Кров, 1998; 92: 737-44.
11. Richardson, P., Murakami, C, Jin, Z., та ін. Багато-інституційне використання дефібротиду у 88 пацієнтів після трансплантації стовбурової клітини з важким захворюванням закупорки вен і багато системним руйнуванням органу: відгук (реакція) без значної токсичності у популяції з високим

ризиком і фактори, які передвіщають результат. Кров, 2002; 100(13): 4337-4343.

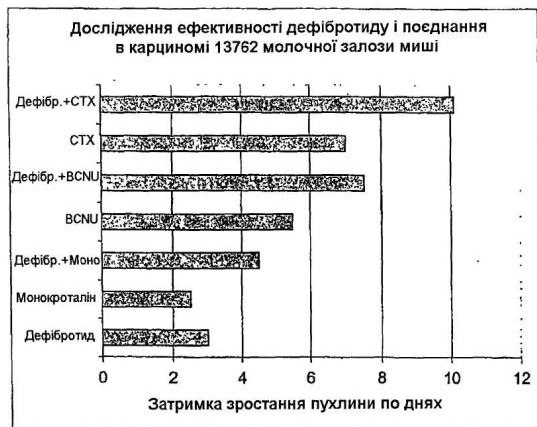
12. Eissner, G., Multhoff, G., Gerbitz, A., та ін. Флударабін спричиняє апоптоз, активацію та аллогенність в ендотеліальних та епітеліальних клі-

тинах людини: захисний ефект дефібротиду. Кров, 2002; 100: 334-340.

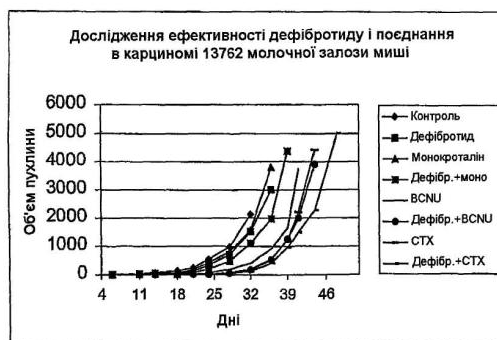
13. Falanga, A., Vignoli, A., Marchetti, M., Barbui, T., Дефібротид зменшує прокоагулянтну активність і збільшує фібринолітичні властивості ендотеліальних клітин. Лейкемія, 2003; друкується.



ФІГ. 1



ФІГ. 2а



ФІГ. 2б