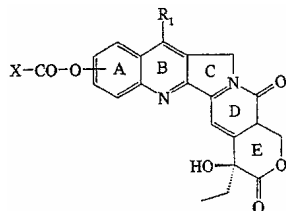


Даний винахід стосується застосування похідних камптотецину, яке не призводить до виникнення вторинних ефектів шлунково-кишкової несприйнятності або має знижені вторинні шлунково-кишкові ефекти. Даний винахід стосується також застосування розчинів хлориду натрію для послаблення вторинних шлунково-кишкових ефектів, зумовлених застосуванням похідних камптотецину.

Відомо, що застосування похідних камптотецину спричиняє численні побічні ефекти. Зокрема, вони найчастіше спричиняють такі порушення шлунково-кишкового тракту, як дуже тяжке блювання та діареї, що може призвести до призупинення лікування.

В європейському патенті EP 137145 описані похідні камптотецину загальної формули:



в якій, зокрема,  $R_1$  позначає водень, галоген або алкіл; X позначає атом хлору або групу  $NR_2R_3$ , в якій  $R_2$  та  $R_3$ , однакові або різні, можуть позначати атом водню, алкільний радикал, можливо, заміщений, карбоцикл або гетероцикл, можливо, заміщений, або алкільні радикали (можливо, заміщені), які утворюють разом з атомом азоту, з яким вони пов'язані, гетероцикл, який може містити ще один гетероатом, вибраний серед O, S і/або  $NR_4$ , де  $R_4$  є атомом водню або алкільним радикалом, а група X-CO-O- знаходиться в положенні 9, 10 або 11 циклу A. Ці похідні камптотецину є протираковими агентами, інгібіторами топоізомерази I, серед яких іринотекан, у якого група X-CO-O- являє собою групу [4-(1-піперидино)-1-піперидино]карбонілокси, є особливо ефективним началом відносно солідних пухлин і, зокрема, відносно колоректального раку.

У патентній заявці EP 74256 описані також інші похідні камптотецину, про які також говорять як про протиракові агенти, зокрема, описані похідні зі структурою, аналогічною наведеній вище, і в якій група X-CO-O- замінена на радикал  $-X'R'$ , в якому X' позначає O або S, а  $R'$  позначає атом водню, алкіл або ацил. Описані також інші похідні камптотецину, наприклад, в патентах або патентних заявках EP 56692, EP 88642, EP 296612, EP 321122, EP 325247, EP 540099, EP 737686, WO 9003169, WO 9637496, WO 9638146, WO 9638449, WO 9700876, US 7104894, JP 57116015, JP 57116074, JP 59005188, JP 60019790, JP 01249777, JP 01246287, JP 91/12070 або в Cane. Res., 38, (1997) Abst. 1526 або 95 (San Diego - 12-16 квітня), Cane. Res., 55(3), 603-609 (1995) або AFMC Int. Med. Chem. Symp. (1997) Abst. PB-55 (Сеул - 27 липня - 1 серпня).

Похідні камптотецину звичайно вводять у вигляді ін'єкцій, переважно внутрішньовенних, у формі стерильного розчину або емульсії. Похідні камптотецину можна також вводити перорально у формі твердих або рідких композицій.

Похідні камптотецину можна також застосовувати у сполученні з іншими протираковими агентами, такими, наприклад, як цисплатина, оксалиплатина, Tomudex®, Taxotere®, 5-фтор-урацил та інгібітори тимидилатсинтази.

На жаль, із вторинних клінічних ефектів, які виникають при лікуванні похідними камптотецину, відмічають, зокрема, появу діарей (третього або четвертого ступеню), холінергічного синдрому, нудоти та блювання. Зокрема, у 38% хворих спостерігаються тяжкі діареї, які можуть стати загрозою для життя хворих через обезводнення і/або пов'язаної з цим інфекції.

З метою зниження кишкової токсичності, зумовленої застосуванням активного начала, були розроблені різноманітні способи боротьби з кишковою токсичністю або її зниження. Однак досі це не призвело до успіху. Звідси витікає, що використання похідних камптотецину обмежене використанням їх лише дуже досвідченими онкологами і стосовно лише декількох категорій хворих, які можуть сприймати ці сполуки.

Заявник виявив, і це становить предмет даного винаходу, що захисту від шлунково-кишкових розладів, викликаних лікуванням похідними камптотецину, можна досягти застосуванням розчину хлориду натрію. Такий захист призводить до специфічного зниження і в деяких випадках усунення вторинних гастроінтестинальних ефектів без зменшення системного впливу активного начала або протипухлинної активності.

Даний винахід стосується застосування хлориду натрію для одержання агента, призначеного для зниження або усунення вторинних шлунково-кишкових ефектів, спричинених застосуванням похідних камптотецину. Згідно з винаходом, агентом, призначеним для зниження або усунення вторинних шлунково-кишкових ефектів, спричинених застосуванням похідних камптотецину, є водний розчин хлориду натрію.

Названий вище захист забезпечують введенням розчину хлориду натрію одночасно з введенням похідних камптотецину або за декілька днів до їх введення, з потім одночасно з їх введенням.

Цей дивний ефект виключно сприятливий і, зокрема, дає можливість запобігти перерви в лікуванні, зумовлених дуже важкими вторинними гастроінтестинальними ефектами.

Згідно з винаходом, розчин хлориду натрію, що використовується, являє собою водний розчин з концентрацією від 4 до 13г/л. Його використовують пероральним способом.

Краща концентрація розчину хлориду натрію, що використовується, становить 9г/л.

Розчин хлориду натрію готують звичайними способами, розчиняючи хлорид натрію у воді (наприклад, в очищеній або стерильній воді). Цей розчин може містити також інші агенти, зокрема, такі як підсолоджуючі або ароматизуючі агенти.

Розчин хлориду натрію можна вводити в дозах від 5 до 10мл/кг один або два рази на добу, починаючи за 5 днів до початку лікування і закінчуючи наступного дня після завершення лікування, при тривалості лікування похідним камптотецину від одного до п'яти днів підряд. Згідно з іншим варіантом застосування розчин хлориду

натрію вводять у дозах від 5 до 10мл/кг один чи два рази на добу впродовж періоду лікування, переважно в дозі 10мл/кг два рази на день впродовж періоду лікування похідним камптотецину від 1 до 14 днів підряд. Другий варіант використання розчину хлориду натрію кращий.

Похідне камптотецину вводять у вигляді ін'єкцій, переважно внутрішньовенних, або пероральним шляхом.

У тому випадку, коли похідні камптотецину вводять внутрішньовенно, їх композиції можуть містити також допоміжні добавки, зокрема, змочуючі, ізотонізуючі, емульгуючі, диспергуючі та стабілізуючі агенти. Як приклад, іринотекан (CPT-11) вводять розчиненим в середовищі для внутрішньовенних ін'єкцій в дозах від 175 до 500мг/м<sup>2</sup>

Похідні камптотецину можна вводити також перорально у вигляді твердих композицій, наприклад, у вигляді твердих желатинових капсул або напівтвердого гідрофільного матрикса їх можна вводити також у вигляді таблеток, пілюль, желатинових та інших капсул, порошоків або гранул. Композиції для перорального застосування мають переважно форму таблеток. Активне начало у всіх цих композиціях змішують, зокрема, з одним або декількома розріджувачами або інертними добавками, такими як цукри, похідні цукрів або гідрофільні макромолекулярні сполуки, такі, зокрема, як сахароза, лактоза, глюкоза, мальтоза, D-фруктоза, сорбіт; крохмалі, такі як крохмаль пшениці, кукурудзи або рису; целюлоза та її похідні, такі, наприклад, як етил- або метилцелюлоза, гідроксиетилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, метилгідроксиметилцелюлоза, метилгідроксипропіл-целюлоза або карбоксиметилцелюлоза; камеді, такі як гумміарабік, адрагантова камедь, гуарова смола; альгірати, каррагенати або декстрини; білки; синтетичні продукти, такі як полівінілпіролідон, високомолекулярні поліетиленгліколи; або такі мінеральні речовини, як колоїдальні кремнеземи або силікати. Ці композиції можуть містити й інші речовини, такі, наприклад, як змащуючі добавки (наприклад, стеарат магнію) або оболонки, призначені для регульованого вивільнення активного начала. Композиції можуть вводитись також у вигляді фармацевтично прийнятних розчинів, суспензій, емульсій, сиропів та елексірів, що містять інертні розріджувачі, такі як вода або масла типу парафінового масла. Крім того, ці композиції можуть містити інші, ніж розріджувачі, речовини, такі як зволожуючі агенти, підсолоджуючі або ароматизуючі агенти, зокрема, цукри або поліолі.

Зрозуміло, що до даного винаходу входять також пакувальні набори, що мають складники, які містять похідне камптотецину і агент на основі хлориду натрію, призначений для зниження або усунення вторинних шлунково-кишкових ефектів, спричинених застосуванням похідних камптотецину.

Придатна будь-яка форма пакувальних наборів, зокрема, придатні (як приклад) упаковки у вигляді двох або більше флаконів; упаковки у вигляді флакона, що містить похідне камптотецину, й ампули або ампул, що містять агент; упаковки у вигляді резервуара для перфузії, який містить похідне камптотецину, і флакона(ів) або ампули(л), що містять агент; упаковки, в яких суміщаються упаковка для перорального застосування, що містить похідне камптотецину, і один (одна) або декілька флаконів або ампул, що містять агент. Зрозуміло, що хлорид натрію у згаданих вище флаконах або ампулах може бути у вигляді призначеного для розведення порошку або у вигляді розчину, зокрема, розчину, готового до застосування.

Даний винахід було продемонстровано в різноманітних випробуваннях, виконаних на миші та собаці в описаних далі умовах.

Приготування розчину для ін'єкцій

Розчин для ін'єкцій на основі трьохводного іринотекангідрохлориду готують із розрахунку 20мг/мл препарату у присутності таких складників:

трьохводний іринотекан-	
гідрохлорид	20мг
D-Сорбіт	45мг
Молочна кислота	0,9мг
Гідроксид натрію	в достатній кількості
	для рН 3,5
Вода для ін'єкційних	в достатній кількості
препаратів	до 1мл

1) Експериментальне дослідження на миші

1.1) Випробування I

Оцінка захисного ефекту розчину хлориду натрію, який застосовують перорально, відносно інтестинальної токсичності CPT-11, який вводять внутрішньовенно.

Миші-самці CD1 (у віці від 5 до 6 тижнів), розділені на дві групи по 10 мишей, одержують у кожній групі по одній внутрішньовенній ін'єкції (20мл/кг із швидкістю 0,5мл/хв.) водного розчину CPT-11 з 9г/л хлориду натрію при дозі 40мг/кг (приблизно 120мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла) впродовж 5 днів з шостого дня по десятий. За цим періодом лікування настає триденний період без лікування (до 13-го дня). Миші в одній із груп одержують поряд з цим щодня впродовж 10 днів (з першого по десятий день) 2 рази на день з перервою приблизно 10 год. перорально по 10мл/кг за приймання водного розчину 9г/л хлориду натрію (група CPT-11/NaCl). Тварини другої групи не одержують перорально водний розчин 9г/л хлориду натрію (група CPT-11).

Летальність та клінічні ознаки спостерігають щодня. Масу тіла записують в 1-й, 6-й, 11-й та 13-й дні. На 13-й день мишей забивають і розтинають. У всіх мишей вирізають цілим шлунково-кишковий тракт, який у тих мишей, які дожили до кінцевого періоду спостереження, піддають мікроскопічному дослідженню.

Летальність, зумовлена застосуванням CPT-11, яка настає на 6-й і 7-й дні, спостерігається у 7 мишей із 15 в групі CPT-11 і лише у 2 із 10 мишей в групі CPT-11/NaCl. Зниження рухливості, тремтіння, конвульсії та/або утруднений подих, зумовлені застосуванням CPT-11, спостерігаються після застосування CPT-11 епізодично. Втрата ваги тіла спостерігається в групах CPT-11 і CPT-11/NaCl під час лікування за допомогою CPT-11. Втрата ваги більш значна в групі CPT-11, ніж у групі CPT-11/NaCl, і продовжує спостерігатись після закінчення лікування в групі CPT-11.

Природа мікроскопічних змін, які спостерігаються у кишковому, відповідає змінам, які очікуються при застосуванні протиракового агента. В обох групах переважають зміни в тонкому кишковому. Ці зміни, в цілому

від помірних до широкіх, характеризуються втратою крипти та укороченням ворсинок. Зміни в кишковику менш значні в групі CPT-11/NaCl, зокрема, мінімальні втрати крипти спостерігаються лише в окремих випадках.

Таким чином, пероральне введення ізотонічного розчину 9г/л хлориду натрію по 10мл/кг за приймання двічі на день (20мл/кг/добу) впродовж п'яти днів попереджує появу гістопатологічних змін у кишковику, зумовлених застосуванням CPT-11.

#### 1.2) Випробування II

Оцінка захисного ефекту різноманітних режимів введення розчину хлориду натрію пероральним шляхом відносно інтестинальної токсичності CPT-11.

Самців мишей CD1 у віці від 5 до 6 тижнів розділяють на 5 груп по 10 мишей у кожній; кожна тварина одержує внутрішньовенну ін'єкцію (20мл/кг зі швидкістю 0,5мл/хв.) водного розчину CPT-11 з 9г/л хлориду натрію при дозі 40мг/кг (приблизно 120мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла) впродовж 5 днів з шостого по десятий день. В групі 1 вводять два рази на день з інтервалом приблизно 10 год. по 10мл/кг за приймання водного розчину хлориду натрію з концентрацією 9г/л з першого по десятий день; в групі 2 - два рази на день по 5мл/кг за приймання з першого по десятий день; в групі 3 - один раз на день по 20мл/кг за приймання з першого по десятий день; в групі 4 - два рази на день по 10мл/кг за приймання з шостого по десятий день. Тварини із групи 5 не одержують розчину 9г/л хлориду натрію.

Летальність та клінічні ознаки спостерігають щодня. Вагу тіла записують на 3-й, 6-й, 10-й та 13-й дні. На 13-й день мишей забивають і розтинають. У всіх мишей вирізають цілим шлунково-кишковий тракт, який у мишей, що дожили до закінчення періоду спостереження, піддають мікроскопічному дослідженню.

Клінічні ознаки, що спостерігаються, в усіх групах подібні тим, які були відмічені в попередньому випробуванні (випробування I). В усіх групах спостерігається зниження ваги тіла.

Мікроскопічні зміни, які спостерігаються в кишковику, відповідають змінам, очікуваним при застосуванні протиракового агента. В усіх групах переважають зміни в тонкому кишковику. Зміни в кишковику менш значні в групах, які одержали розчин 9г/л хлориду натрію пероральним шляхом порівняно з групою, в якій лікування здійснювалось тільки CPT-11. Навпаки, частота і тяжкість змін у кишковику ідентичні для груп 1-4, які одержували розчин 9г/мл хлориду натрію перорально в різних режимах застосування.

Таким чином, пероральне застосування ізотонічного розчину 9г/л хлориду натрію один чи два рази на день в різних режимах застосування (від 5 до 20мл/кг за приймання) до та під час або тільки під час внутрішньовенного застосування CPT-11 впродовж п'яти днів попереджує появу гістопатологічних змін в кишковику, зумовлених застосуванням CPT-11.

#### 1.3) Випробування III

Оцінка захисного ефекту ізотонічного розчину хлориду натрію, який вводять пероральним шляхом, на інтестинальну і системну токсичність CPT-11 і токсикокінетику CPT-11 і її головного метаболіта SN-38.

Самців мишей CD1 у віці від 5 до 6 тижнів розділяють на 3 групи по 10 мишей. Тварини двох груп одержують внутрішньовенну ін'єкцію (20мл/кг зі швидкістю 0,5мл/хв.) водного розчину CPT-11 з 9г/л хлориду натрію при дозі 40мг/кг (приблизно 120мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла) впродовж 5 днів з першого по п'ятий день. За цим періодом лікування настає триденний період без лікування (до восьмого дня). Миші в одній із груп одержують поряд з цим щоденно впродовж 5 днів (з першого по п'ятий день) 2 рази на день з перервою приблизно 10 годин перорально по 10мл/кг за приймання водного розчину 9г/л хлориду натрію, добовий об'єм 20мл/кг (група CPT-11/NaCl). Тварини із другої групи не одержують перорально водний розчин 9г/л хлориду натрію (група CPT-11). Миші із третьої групи, які не одержували CPT-11, одержують водний розчин 9г/л хлориду натрію 2 рази на день з перервою приблизно 10 годин перорально по 10мл/кг за приймання впродовж п'яти днів (з першого по п'ятий день) (контрольна група). 36 додаткових тварин в групах CPT-11 та CPT-11/NaCl використовують для визначення плазматичних концентрацій CPT-11 і його головного метаболіта SN-38.

Летальність і клінічні ознаки спостерігають щоденно.

Вагу тіла вимірюють в 1-й, 3-й, 6-й та 8-й дні. Забір плазми для токсикокінетичного аналізу здійснюють в 1-й та 5-й дні. На 8-й день мишей забивають і розтинають. Вимірюють абсолютну та відносну вагу тимусу, селезінки та насінників і вирізають у всіх мишей цілим шлунково-кишковий тракт, грудинний кістковий мозок, тимус, селезінку, насінники та їх придатки з метою проведення мікроскопічного дослідження.

Максимальні плазматичні концентрації ( $C_{max}$ ) і площі під кривою (AUC), виміряні для CPT-11 та його головного метаболіта SN-38 в 1-й та 5-й дні, однакові у тварин груп CPT-11 та CPT-11/NaCl.

Летальність, зумовлена застосуванням CPT-11, яка настає на восьмий день, спостерігається у 1 із 10 мишей в групі CPT-11/NaCl. Послаблення рухливості і утруднене дихання, зумовлене застосуванням CPT-11, спостерігаються після застосування CPT-11 в групах CPT-11 і CPT-11/NaCl епізодично, причому в групі CPT-11/NaCl в більш важкій формі. Втрата ваги тіла, що спостерігається в процесі лікування за допомогою CPT-11, однакова в групах CPT-11 і CPT-11/NaCl і продовжується після закінчення лікування.

Мікроскопічні зміни, що спостерігаються в тимусі і кишковику, узгоджуються із змінами, які очікуються при застосуванні протиракового агента. Мікроскопічні зміни, що спостерігаються в тимусі тварин в групах CPT-11 та CPT-11/NaCl, схожі між собою і характеризуються лімфоїдним виснаженням, пов'язаним із зменшенням ваги та розмірами цього органу. Мікроскопічні зміни у кишковику переважають в тонкому кишковику для груп CPT-11 і CPT-11/NaCl і характеризуються головним чином втратою крипти і атрофією ворсинок. Зміни у кишковику в групі CPT-11/NaCl менш серйозні, ніж у групі CPT-11.

Таким чином, пероральне введення ізотонічного розчину 9г/л хлориду натрію по 10мл/кг за приймання двічі на день (20мл/кг/добу) в процесі внутрішньовенного застосування CPT-11 впродовж п'яти днів не змінює системного впливу CPT-11 і SN-38, не впливає на тимусну токсичність CPT-11, але вибірково знижує важкість змін у кишковику, спричинених CPT-11.

#### 1.4) Випробування IV

Оцінка ефекту перорального введення розчину хлориду натрію на протипухлинну активність CPT-11, який вводять внутрішньовенно.

Самок мишей C3H/HeN з аденокарциномою молочної залози MA16/C, імплантованою підшкірно в перший

день, розділяють на дві групи, і в кожній з них тварини одержують по одній внутрішньовенній ін'єкції (20мл/кг) водного розчину CPT-11 з 5% глюкози при дозі 14,6; 23,6; 38,0 або 61,3мг/кг впродовж п'яти днів з шостого дня по десятий. Миші в одній із груп одержують поряд з цим щодня впродовж 10 днів (з першого по десятий день) 2 рази на день з перервою приблизно 10 годин перорально по 10мл/кг за приймання водного розчину 9г/л хлориду натрію, добовий об'єм 20мл/кг, (група CPT-11/NaCl). Тварини із другої групи не одержують перорально водний розчин 9г/л хлориду натрію (група CPT-11).

Протипухлинну активність CPT-11 оцінюють при максимальній нетоксичній дозі. Дозу, яка призводить до втрати ваги тіла більше, ніж 20%, або до частоти зумовлених застосуванням CPT-11 летальних випадків більше, ніж 20%, розглядають як дуже токсичну. До складу оцінених параметрів входять виражене в % інгібування росту пухлини (T/C), затримка зростання пухлини (T-C) та кількість забитих пухлинних клітин (Log кількості забитих клітин тумору-T-C /3,32хчас подвоєння пухлини). Значення Log кількості забитих клітин тумору, що становить 0,7, відповідає мінімальній активності, в той час як значення більше 2,8 відповідає рівню підвищеної активності.

Максимальна нетоксична доза CPT-11 для тварин групи CPT-11 становить 23,6мг/кг/добу, що відповідає сумарній накопиченій дозі 118мг/кг; при цьому максимальна втрата ваги тварин становить 10% на 11-й день, а значення Log кількості забитих клітин тумору становить 1,7. Для тварин групи CPT-11/NaCl максимальна нетоксична доза CPT-11 становить 38,0мг/кг/добу, що відповідає сумарній накопиченій дозі 190мг/кг; при цьому максимальна втрата ваги становить 14,1% на 12-й день, а значення Log кількості забитих клітин становить 2,3.

Таким чином, пероральне введення ізотонічного розчину 9г/л хлориду натрію по 10мл/кг за приймання двічі на день (20мл/кг/доба) впродовж п'яти днів до і в процесі внутрішньовенного застосування CPT-11 впродовж п'яти днів не знижує протиракової активності CPT-11.

## 2) Експериментальне дослідження на собаці

Оцінка захисного ефекту розчину хлориду натрію, який вводять перорально, на інтестинальну токсичність CPT-11, який вводять внутрішньовенно.

Шість самок гончих у віці від 10 до 12 місяців розділяють на дві групи по 3 собаки в кожній, і в кожній із двох груп тварини одержують по одній внутрішньовенній ін'єкції (5мл/кг зі швидкістю 2мл/хв.) водного розчину CPT-11 з 9г/л хлориду натрію при дозі 20мг/кг (приблизно 400мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла) на шостий день. Тварини в одній із груп одержують поряд з цим щодня впродовж 7 днів (з першого по сьомий день) 2 рази на день з перервою приблизно 8 годин перорально по 10мл/кг за приймання водного розчину 9г/л хлориду натрію, добовий об'єм 20мл/кг (група CPT-11/NaCl); починаючи за 5 днів до і закінчуючи наступного дня після застосування CPT-11. Тварини другої групи не одержують перорально водний розчин 9г/л хлориду натрію (група CPT-11). Після останнього застосування 9г/л хлориду натрію тварини нічого не одержують впродовж 2 днів (до 9-го дня).

Летальність та клінічні ознаки спостерігають щодня. Вагу тіла записують впродовж періоду, попереднього перед випробуванням, і в 5-й та 9-й дні. Тварин забивають і розтинають на 9-й день. У всіх тварин взяли вибіркові зразки тканин шлунково-кишкового тракту і піддали мікроскопічному аналізу.

До складу ефектів, зумовлених застосуванням CPT-11 впродовж періоду лікування, входять сльотеча, збудження, блювання (під час або безпосередньо після введення CPT-11), проноси і невелика втрата ваги. Дослідження товстого кишечника дало можливість виявити почервоніння на слизовій оболонці, яке в групі CPT-11 з'являлось частіше, ніж у групі CPT-11/NaCl. Зміни, які спостерігаються (від помірних до помітних у групі CPT-11 і від мінімальних до легких в групі CPT-11/NaCl), виникають внаслідок первинної зміни проліферативного відділу і полягають в дегенерації слизової оболонки.

Таким чином, внутрішньовенне введення одиничної дози CPT-11 на собаках-самках в дозі 20мг/кг викликає гастроінтестинальну токсичність, сумісну з антимиіотичною активністю продукту. Пероральне введення ізотонічного розчину 9г/л хлориду натрію по 10мл/кг за приймання двічі на день (20мл/кг/добу) впродовж п'яти днів до і в день застосування CPT-11 попереджує появу гістопатологічних змін, які спричиняє CPT-11.