



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 109571

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/41 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

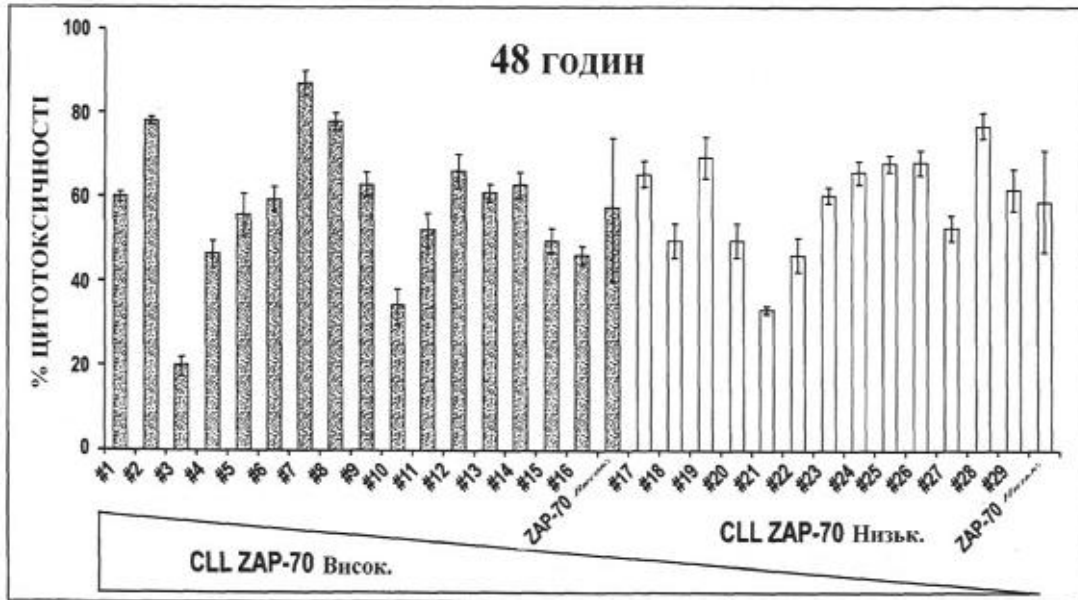
(21)	Номер заявки:	а 2013 11750	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Roberto Alonso. The Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitor Forodesine (BCX-1777) Is a Potent Cytotoxic Agent and Has Synergistic Activity with Bendamustine in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Irrespective of ZAP-70 Levels and p53 Status/ Roberto Alonso, Neus Villamor, Ramanda Upshaw, Shanta Bantia, Thomas Mehrling, Elias Campo, Emili Montserrat, Dolores Colomer// Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).-2007. Vol. 110.- Abst. 3122 реферат (1 стор.) Bergmann MA. Efficacy of bendamustine in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase I/II study of the German CLL Study Group/Bergmann M.A., Goebeler M.E., Herold M., Emmerich B., Wilhelm M., Ruelfs C., Boening L., Hallek M.J// Haematologica. -Oct.- 2005.- 90(10).- p. 1357-64 (8 стор.) Kath R. Bendamustine, vincristine, prednisolone (BOP) in therapy of advanced low-grade non-Hodgkin lymphoma/Kath R, Blumenstengel K, Fricke HJ, Peters HD, Hoffken K. // Dtsch Med Wochenschr. - Feb 23.-2001. - 126(8). – p.198-202. Реферат (1 стор.) Duvic M. Systemic monotherapy vs combination therapy for CTCL: rationale and future strategies/Duvic M./Oncology (Williston Park). – Feb. - 2007. – vol. 21(2 Suppl 1). – p. 33-40. Реферат (1 стор.) Galmarini C.M. Drug evaluation: forodesine - PNP inhibitor for the treatment of leukemia, lymphoma and solid tumor/ Galmarini C.M./ IDrugs. Oct. -2006.- vol.9(10). – p. 712-22 реферат (1 стор.) Aivado M. Bendamustine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: results and future perspectives /Aivado M, Schulte K, Henze L, Burger J, Finke J, Haas R // Semin Oncol. - Aug. – 2002.- 29(4 Suppl 13):19-22. (4 стор.)
(22)	Дата подання заявки:	10.12.2008		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.09.2015		
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/012,762		
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	10.12.2007		
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	25.02.2014, Бюл.№ 4		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	10.09.2015, Бюл.№ 17		
(62)	Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	, а201008568, 10.12.2008		
(72)	Винахідник(и):	Шента Бентіа (US/US), Філіп Брейтфілд (US/US), Ярлагадда С. Бейбу (US/US)		
(73)	Власник(и):	БАЙОКРІСТ ФАРМАСЬОТИКАЛЗ, ІНК., 2190 Parkway Lake Drive, Birmingham, AL 35244, United States of America (US)		
(74)	Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9		

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ РАКУ КРОВОТВОРНОЇ СИСТЕМИ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ФОРОДЕЗИНУ В КОМБІНАЦІЇ З БЕНДАМУСТИНОМ, А ТАКОЖ ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ТА КОМПЛЕКТ, ЩО ЇХ МІСТЯТЬ

(57) Реферат:

UA 109571 C2

Винахід належить до галузі медицини, стосується лікування різних видів раку кровотворної системи, причому лікування може включати, наприклад, введення інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP), алкілюючого агента та/або агента проти CD20, а також відповідних композицій та комплектів.



Фиг. 1А

Галузь винаходу

Ця заявка стосується лікування раку кровотворної системи, наприклад раку крові, з застосуванням способів, до яких належать введення пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) інгібітор. Зокрема, описуються способи лікування хронічного лімфоцитарного лейкозу (CLL) та

5 гострого лімфоцитарного лейкозу (ALL).

Споріднені заявки

Ця заявка заявляє пріоритет заявки США під реєстраційним номером 61/012,762, поданої 10 грудня 2007 р., зміст якої включено шляхом посилання.

Рівень техніки

10 У наш час рак займає друге місце серед причин смерті у Сполучених Штатах Америки. Рак було діагностовано у 8000000 осіб у США. У 1995 р. спричинив 23,3 % усіх смертей у Сполучених Штатах Америки (див., наприклад, U.S. Dept. of Health and Human Services, National Center for Health Statistics, Health United States 1996-97 and Injury Chartbook 117 (1997)).

Нині рак піддають лікуванню з застосуванням одного з трьох нижчезазначених типів терапії або їх комбінації: хірургія; опромінення; та хіміотерапія. Хірургія передбачає видалення великого об'єму ураженої тканини. Хоча хірургія часом є ефективною для видалення пухлин, які знаходяться у деяких місцях, наприклад, у молочній залозі, товстій кишці та шкірі, вона не може застосовуватися ні для лікування від пухлин, розташованих в інших місцях, таких, як хребет, ні для лікування від дисемінованих неопластичних станів, таких, як лейкоз. Променева терапія передбачає піддавання живої тканини іонізуючому опроміненню, яке спричинює відмирання або пошкодження клітин, які зазнали такого опромінення. Побічні ефекти променевої терапії можуть бути гострими і тимчасовими, але деякі можуть бути незворотними. Хіміотерапія передбачає перешкоджання реплікації клітин або метаболізму клітин. Найчастіше її застосовують для лікування раку молочної залози, легенів та яєчка. Однією з головних причин невдач цього способу лікування раку є розвиток резистентності ракових клітин до ліків, що становить

25 серйозну проблему, яка може призводити до рецидиву хвороби або навіть смерті. Таким чином, існує потреба у більш ефективних способах лікування від раку.

Короткий опис винаходу

Авторами пропонується спосіб лікування раку кровотворної системи (наприклад, CLL та

30 ALL) у суб'єкта. Спосіб включає етапи: (а) введення суб'єктові ефективної кількості інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP); та (b) введення суб'єктові ефективної кількості алкілюючого агента або агента проти CD20. У деяких варіантах втілення інгібітором PNP є Фородезин. В інших варіантах втілення алкілюючий агент є вибраним з-поміж похідної гірчиці, похідної нітрососечовини, платинової сполуки та імідазол-карбоксамідної сполуки. У деяких

35 варіантах втілення алкілюючим агентом є Бендамустин. У деяких варіантах втілення агентом проти CD20 є Ритуксимаб.

У деяких варіантах втілення інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять одночасно, а в інших варіантах втілення інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять послідовно. В останньому варіанті втілення алкілюючий агент або агент

40 проти CD20 вводять один або кілька разів перед введенням інгібітору PNP.

В іншому варіанті втілення спосіб лікування раку кровотворної системи у суб'єкта з резистентністю до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів (наприклад, алкілюючого агента, такого, як Бендамустин, та аналога пуриннуклеозиду, такого як Флударабін) може включати етапи: (а) виявлення суб'єкта з резистентністю до одного або кількох

45 хіміотерапевтичних засобів; та (b) введення суб'єктові інгібітору PNP. У конкретних варіантах втілення інгібітором PNP є Фородезин.

В інших варіантах втілення спосіб лікування суб'єкта з раком кровотворної системи може включати етапи: (а) виявлення делеції р53 в одній або кількох ракових клітинах у зразку, взятому з організму суб'єкта; та (b) введення суб'єктові інгібітору PNP. У деяких варіантах

50 втілення інгібітором PNP є Фородезин. У деяких варіантах втілення спосіб також може включати виявлення наявності делеції 17p та/або визначення, чи є одна або кілька ракових клітин у зразку резистентними до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів (наприклад, алкілюючого агента та аналога пуриннуклеозиду).

Авторами також пропонується фармацевтична композиція, яка включає інгібітор PNP та

55 алкілюючий агент або агент проти CD20.

Авторами також пропонується комплект, який включає інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20. У деяких варіантах втілення комплект також може включати систему доставлення для інгібітору PNP, алкілюючого агента, агента проти CD20 або будь-якої їх комбінації. В іншому варіанті втілення комплект також може включати інструкції з лікування

60 суб'єкта.

В іншому варіанті втілення комплект включає інгібітор PNP. В одному варіанті втілення комплект також включає ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення суб'єктові з резистентністю до алкілюючого агента. У деяких варіантах втілення комплект також включає ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення суб'єктові з делецією р53. В останньому варіанті втілення комплект може включати ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення з алкілюючим агентом або агентом проти CD20.

У деяких варіантах втілення пропонується застосування інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) та алкілюючого агента для приготування медикамента, призначеного для лікування раку кровотворної системи у тварини.

У деяких варіантах втілення пропонується застосування інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) та агента проти CD20 для приготування медикамента, призначеного для лікування раку кровотворної системи у тварини.

У деяких варіантах втілення пропонується застосування інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) та алкілюючого агента для лікування раку кровотворної системи.

У деяких варіантах втілення пропонується застосування інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) та агента проти CD20 для лікування раку кровотворної системи.

Деталі одного або кількох варіантів втілення винаходу представлено на супровідних кресленнях та подальшому описі. Інші особливості, цілі та переваги стануть зрозумілими з опису та фігур, а також формули винаходу.

Опис фігур

Фігура 1A та 1B детально показує цитотоксичний ефект Фородезину у клітинах CLL, які демонструють високий та низький рівень ZAP-70.

Фігура 2 показує зв'язок між внутрішньоклітинним підвищенням рівня dGTP після лікування Фородезином та кількістю відмерлих клітин в результаті такого лікування.

Фігура 3 детально показує значення випадків CLL з делецією р53 з високою реакцією на Фородезин.

Фігура 4 показує дані для випадків лікування CLL Фородезином з низькою або відсутньою чутливістю до лікування Бендамустином або Флударабіном.

Фігура 5A та 5B показує дані комбінованих показників для Фородезину/Бендамустину та Фородезину/Флударабіну.

Фігура 6 детально показує дані комбінованих показників для Фородезину/Ритуксимабу.

Детальний опис

Як описується авторами, лікування фородезином викликало залежне від часу та дози відмирання клітин у первинних клітинах CLL. Цитотоксична реакція, вища за 60 %, при 2 мкМ фородезину та 20 мкМ dGuo спостерігалася у 48 % випадків, і лише у 9 % випадків цитотоксичність була нижчою за 40 %. Не спостерігалось розбіжностей у реакції стосовно генетичних відхилень, таких, як делеції 17p13 (TP53) та 11q22-q23 (ATM), генетичних відхилень, набутих при запущених хворобах і пов'язаних з резистентністю до ліків і у пацієнтів CLL з коротким терміном виживання. Випадки CLL зі змінами у р53 або 11q виявляли високу чутливість до фородезину (середня цитотоксичність 60,1 % через 48 годин), з доброю цитотоксичною реакцією, яка досягалася у стійких до хіміотерапії пацієнтів з CLL. Комбінація фородезину з клінічними антилейкозними режимами посилювала *in vitro* цитотоксичні реакції, з сильним синергетичним ефектом, який спостерігався при комбінації фородезину з низькими дозами бендамустину, моноклонального антитіла проти CD20 ритуксимабу або циклофосфаміду. Натомість антагоністичний ефект спостерігався при флударабіні. Таким чином, фородезин являє собою новий хіміотерапевтичний засіб, здатний викликати апоптоз клітин CLL в обхід шляху ATM/p53.

Відповідно, у деяких варіантах пропонуються способи лікування раку кровотворної системи у суб'єкта, які включають етапи введення суб'єктові ефективної кількості інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP); та введення суб'єктові ефективної кількості алкілюючого агента або агента проти CD20.

У деяких варіантах втілення інгібітором PNP є Фородезин.

У деяких варіантах втілення алкілюючий агент є вибраним з-поміж похідної гірчиці, похідної нітрозосечовини, платинової сполуки та імідазол-карбоксамідної сполуки.

У деяких варіантах втілення алкілюючим агентом є похідна гірчиці.

У деяких варіантах втілення алкілюючим агентом є Бендамустин.

У деяких варіантах втілення агентом проти CD20 є Ритуксимаб.

У деяких варіантах втілення інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять одночасно.

У деяких варіантах втілення інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять послідовно.

5 У деяких варіантах втілення алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять один або кілька разів перед введенням інгібітору PNP.

У деяких варіантах втілення рак кровотворної системи є вибраним з-поміж хронічного лімфоцитарного лейкозу та гострого лімфобластного лейкозу.

10 У деяких варіантах втілення рак кровотворної системи є хронічним лімфоцитарним лейкозом.

У деяких варіантах втілення рак кровотворної системи є гострим лімфобластним лейкозом.

У деяких варіантах втілення суб'єктові вводять ефективну кількість алкілюючого агента.

У деяких варіантах втілення суб'єктові вводять ефективну кількість агента проти CD20.

15 У деяких варіантах втілення способів ці способи включають введення суб'єктові ефективної кількості інгібітору PNP, ефективної кількості алкілюючого агента та ефективної кількості агента проти CD20.

У деяких варіантах втілення інгібітор PNP, алкілюючий агент та агент проти CD20 вводять одночасно.

20 У деяких варіантах втілення інгібітор PNP, алкілюючий агент та агент проти CD20 вводять послідовно.

У деяких варіантах втілення алкілюючий агент та агенти проти CD20 вводять один або кілька разів перед введенням інгібітору PNP.

25 У деяких варіантах втілення пропонуються способи лікування раку кровотворної системи у суб'єкта з резистентністю до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів, які включають етапи виявлення суб'єкта з резистентністю до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів; та введення суб'єктові інгібітору PNP.

У деяких варіантах втілення суб'єкт є резистентним до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів, вибраних з групи, до якої належать алкілюючий агент та аналог пуриннуклеозиду.

30 У деяких варіантах втілення алкілюючим агентом є Бендамустин.

У деяких варіантах втілення аналогом пуриннуклеозиду є Флударабін.

У деяких варіантах втілення пропонуються способи лікування суб'єкта з раком кровотворної системи, які включають етапи виявлення делеції р53 в одній або кількох ракових клітинах у зразку, взятому з організму суб'єкта; та введення суб'єктові інгібітору PNP.

35 У деяких варіантах втілення способи також можуть включати виявлення наявності делеції 17p.

У деяких варіантах втілення способи також можуть включати визначення, чи є одна або кілька ракових клітин у зразку резистентними до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів.

40 У деяких варіантах втілення ракова клітина або клітини є резистентними до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів, вибраних з групи, до якої належать алкілюючий агент та аналог пуриннуклеозиду.

У деяких варіантах пропонуються фармацевтичні композиції, які включають інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20.

У деяких варіантах втілення композиція включає Фородезин та Бендамустин.

45 У деяких варіантах втілення композиція включає Фородезин та Ритуксимаб.

У деяких варіантах втілення композиція включає інгібітор PNP, алкілюючий агент та агент проти CD20.

У деяких варіантах втілення композиція включає Фородезин, Бендамустин та Ритуксимаб.

50 У деяких варіантах пропонуються комплекти, які включають інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20.

У деяких варіантах втілення комплекти також можуть включати систему доставки для інгібітору PNP, алкілюючого агента, агента проти CD20 або будь-якої їх комбінації.

У деяких варіантах втілення комплекти також можуть включати інструкції з лікування суб'єкта.

55 У деяких варіантах втілення комплекти включають інгібітор PNP та алкілюючий агент.

У деяких варіантах втілення комплекти включають інгібітор PNP та агент проти CD20.

У деяких варіантах втілення комплекти включають Фородезин та Бендамустин.

У деяких варіантах втілення комплекти включають Фородезин та Ритуксимаб.

60 У деяких варіантах втілення комплекти включають інгібітор PNP, алкілюючий агент та агент проти CD20.

У деяких варіантах втілення комплекти включають Форорезин, Бендамустин та Ритуксимаб.

У деяких варіантах пропонуються комплекти, які включають інгібітор PNP.

У деяких варіантах втілення комплекти включають ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення суб'єктові з резистентністю до алкілюючого агента.

5 У деяких варіантах втілення комплекти також включають ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення суб'єктові з делецією p53.

У деяких варіантах втілення комплекти також включають ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення з алкілюючим агентом або агентом проти CD20.

10 На відміну від інших нуклеозидних аналогів, форорезин не включається до ДНК. Лікування форорезином веде до підвищення dGTP у клітинах CLL, і це підвищення є пов'язаним з цитотоксичністю клітин, вказуючи на те, що рівень dGTP, досягнутий після лікування Форорезином, є сурогатним маркером, який свідчить про цитотоксичну реакцію. Сприйнятливість CLL до форорезину може бути зумовлена високою активністю dCK, яка спостерігається у цих клітинах, активністю, яка позитивно регулюється фосфорилуванням dCK на Ser-74. Значна позитивна кореляція спостерігалася між співвідношенням фосфо-dCK/dCK та викликаним форорезином апоптозом. DCK також каталізує фосфорилування, яке вимагається для активації деяких антилейкозних нуклеозидних аналогів, таких, як флударабін, гемцитабін або кладрибін. Антагоністичний ефект, який спостерігався між форорезином та флударабіном, може пояснюватися зниженням рівня dGTP, що спостерігається після комбінування флударабіну з форорезином. Ці результати свідчать, що фосфорилування dCK та наступне підвищення dGTP відіграють важливу роль як перші етапи викликання апоптозу форорезином у клітинах CLL.

25 Було запропоновано кілька механізмів опосередкованого dGTP відмирання клітин. Наприклад, накопичені дезоксинуклеозиди можуть фосфорилуватися у мітохондріях дезоксигуанозинкіназою та тимідинкіназою, що призводить до ненормального накопичення dNTP, які можуть втручатися у синтез та відновлення мітохондріальної ДНК, підвищуючи чутливість до мітохондріального пошкодження, активацію та апоптоз p53. Дисбаланс у мітохондріальному dGTP також може впливати на синтез та/або інактивацію мітохондріального АТР протиокиснювальних ферментів мітохондріального ланцюга перенесення електронів, що веде до вироблення ROS. Мітохондріальний геном є високочутливим до пошкодження через окиснювальний стрес, що може швидко викликати апоптоз. Як описано авторами, форорезин активує мітохондріальний апоптичний шлях через вироблення ROS та втрату $\Delta\psi_m$, що призводить до залежного та незалежного від каспази апоптозу. ROS виробляються через мітохондріальне перенесення електронів і при сильному окиснювальному стресі підвищення рівня O_2^- , OH^- або H_2O_2 провокує втрату $\Delta\psi_m$ та відмирання клітин. Ці явища, викликані форорезином, усувалися шляхом попередньої інкубації клітин CLL з Tiron та NAC, специфічними акцепторами O_2^- , що підтверджує роль окиснювального стресу, що передую активзації мітохондріального апоптичного шляху. Фосфорилування та активація p53 викликається реакцією на пошкодження ДНК, а також деякими стресовими сигналами. Надмірне вироблення супероксиду та наступне викликання пошкодження ДНК можуть викликати апоптоз шляхом активації опосередкованого ROS мітохондріального шляху та активації p53. У цьому сенсі вироблення ROS, викликане форорезином, може діяти як попередній регулятор активації p53. Авторами описуються результати, які демонструють стабілізацію p53 у випадках CLL з p53 дикого типу, а також те, що форорезин активує мітохондріальний апоптичний шлях у випадках зі змінами p53, вказуючи на те, що форорезин діє через інший і/або додатковий механізм, незалежний від p53. Окиснювальний стрес та вироблення ROS також призводить до активації фактора транскрипції E2F-1, який регулює як залежний, так і незалежний від p53 апоптоз через інші шляхи. E2F-1 підвищує фосфорилування p53 у залишках, які також фосфорилуються у відповідь на пошкодження ДНК, але також може викликати відмирання клітин шляхом активації гомолога p53 p73 через p53-незалежний апоптичний шлях. Яким чином вироблення ROS може регулювати активацію E2F-1, p53 та/або p73 і відмирання клітин, і досі залишається малозрозумілим.

Ранньою подією мітохондріального апоптичного шляху є утворення апоптосоми та активація каспази-9, яка розщеплює й активує каспазу-3, а також каспазу-8. Форорезин викликав пов'язану з часом активацію каспази-9 та -3, а також прокаспази-8 одночасно з активацією каспази-9. У свою чергу каспаза-8 викликає розщеплення білка BID до його проапоптичної зрізаної форми, яка активує мітохондріальний апоптичний шлях. Вибіркове інгібування каспази-8 зменшує втрату $\Delta\psi_m$, викликану форорезином, але вплив на відмирання клітин згодом уповільнюється, що вказує на те, що каспаза-8/BID веде до петлі посилення мітохондріального апоптичного шляху. Сама по собі активація каспази-9 може бути недостатньою для викликання

апоптозу, тому активація каспази-8/BID разом зі зниженням інгібіторів апоптозу XIAP та сурвівіну підвищує активність каспази-9 та -3 і, таким чином, посилює апоптоз, викликаний фородезином.

Група білків BCL-2 контролює схильність до апоптичного відмирання клітин. Баланс між сприяючими виживанню, такими, як BCL-2 та MCL-1, і проапоптичними представниками BCL-2 (BAX, BAK та лише BH3-білки BIM, PUMA, NOXA, BAD, BID, Bmf, BIK та HRK) контролює результати багатьох сигнальних шляхів смерті. У пацієнтів з CLL високий рівень BCL-2 та MCL-1 корелюється з прогресуванням хвороби, поганою виживаністю та неможливістю досягнення повної реакції на терапію з застосуванням алкілюючих агентів, нуклеозидних аналогів та ритуксимабу. Фородезин викликає накопичення білка BIM та зниження рівня MCL-1 без змін рівня BCL-2. У клітинах CLL BIM є пов'язаним з MCL-1, тому зниження рівня MCL-1 робить клітини CLL сприйнятливими до цього лише BH3-білка. BIM, а також зрізаний Bid, мають подвійну функцію і як інгібітори антиапоптичних представників BCL-2 і прямих активаторів проапоптичних BAX та BAK. У цьому сенсі підвищення рівня BIM, разом з активацією Bid, веде до активації BAX та BAK і разом зі зниженням MCL-1 долається решта антиапоптичної здатності BCL-2. Представлені авторами результати показують, що ступінь зниження MCL-1 разом з підвищенням BIM, що забезпечується фородезином, значною мірою корелюється з викликанням апоптозу, і базовий рівень MCL-1 та BIM може визначати чутливість клітин CLL до фородезину.

Було продемонстровано активацію мітохондріального апоптичного шляху, незалежного від стану p53. Повідомлялося, що індукція p73, транскрипційної мішені p53, здатна долати резистентність до апоптозу клітин CLL без функціонального p53. У відповідь на кілька хіміотерапевтичних медикаментів проапоптична форма p73, TAp73, трансактивує кілька генів-мішеней p53, які контролюють блокування клітинного циклу та апоптоз у спосіб, залежний, а також незалежний від стану p53. Було виявлено, що фородезин індукує p53, а також TAp73 у клітинах CLL з функціональним p53, але цікавим є те, що рівень mPINK p73 та білка також підвищується у клітинах CLL з делецією p53. Окиснювальний стрес та вироблення ROS веде до активації TAp73, а також E2F1, обидва з яких є білками, задіяними в активації мітохондріального апоптичного шляху через p53-залежні та незалежні механізми. Таким чином, підвищення ROS, викликане фородезином, може забезпечувати сигнал, який активує E2F-1 і/або підвищує TAp73. Група FOXO факторів транскрипції регулює експресію багатьох генів, задіяних в апоптозі, і може бути активована через збільшення окиснювального стресу. FOXO1 та FOXO3a є транскрипційними мішенями E2F-1 і виявилися суттєвими для викликаного ROS апоптозу, а також є факторами транскрипції експресії BIM у кровотворних клітинах. Крім того, після кількох апоптичних подразників, Акцептори ROS блокують індукцію FOXO3a та BIM. Було описано, що експресія FOXO1a та BIM і наступний апоптоз регулюються p73 у пухлинних клітинах без p53. Після лікування Фородезином було продемонстровано мічену білком та mPINK підвищувальну регуляцію p73 та BIM незалежно від стану p53, а також підвищення рівня FOXO1 та FOXO3a, яке було виявлено ще раніше. Експресія регульованих FOXO генів-мішеней може контролюватися будь-яким з представників FOXO, що свідчить про надлишковий механізм дії, як показує транскрипційна регуляція BIM під впливом як FOXO1A, так і FOXO3A.

Таким чином, описані авторами результати свідчать про механізм, задіяний у викликаному фородезином відмиранні клітин у клітинах CLL незалежно від стану p53, виявляючи, що різні запрограмовані шляхи відмирання клітин можуть співіснувати в одній клітині і можуть вибірково викликатися різними подразниками.

Ці результати свідчать, що фородезин як окремий агент або у комбінації з бендамустином або ритуксимабом є високоефективним для лікування CLL. Таким чином, фородезин, доступний у формі композиції, наприклад, для перорального та внутрішньовенного введення з низькими профілями токсичності, є оптимальним засобом лікування для пацієнтів з невітніми прогнозами (наприклад, 17p-), пацієнтів зі стійкою хворобою, та/або як оптимальний засіб лікування для літніх пацієнтів. Було розпочато багатоцентрове відкрите клінічне випробування I фази для фородезину у пацієнтів з рецидивним CLL.

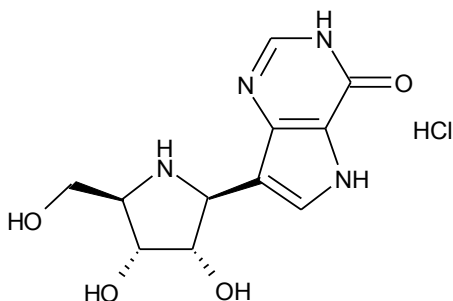
А. Способи лікування раку кровотворної системи

Авторами пропонуються способи лікування у суб'єкта раку кровотворної системи, наприклад, раку крові. Прикладами цих типів раку є, наприклад, гострий мієлоїдний лейкоз, хронічний мієлоїдний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз (ALL), хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), мієлопроліферативні хвороби, множинна мієлома та мієлодиспластичний синдром, лімфома Ходжкіна, неходжкінська лімфома (злоякісна лімфома) та Макроглобулінемія Вальденстрема. У деяких варіантах втілення раком кровотворної системи є CLL. В інших варіантах втілення раком кровотворної системи є ALL.

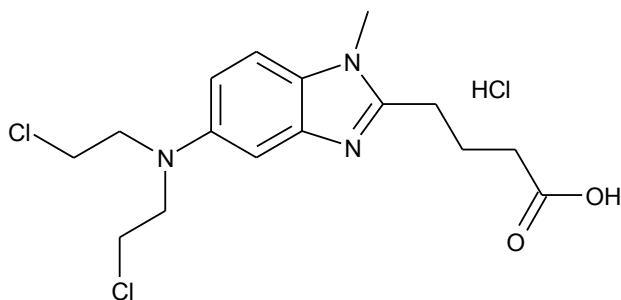
Суб'єктами можуть бути як ссавці, так і відмінні від ссавців тварини. До ссавців належать, наприклад, людина; інші примати, наприклад, людиноподібні та інші мавпи; велика рогата худоба; коні; вівці; щури; миші; свині та кози. До відмінних від ссавців тварин належать, наприклад, типи та птахи.

В одному варіанті втілення спосіб включає введення суб'єктові інгібітору пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) та алкілюючого агента або агента проти CD20. У деяких варіантах втілення вводять інгібітор PNP та алкілюючий агент. В іншому варіанті втілення вводять інгібітор PNP та агент проти CD20. У ще одному варіанті втілення інгібітор PNP вводять після виявлення суб'єкта з резистентністю до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів (наприклад, Бендамустину або Флударабіну). В іншому варіанті втілення інгібітор PNP вводять після виявлення у суб'єкта делеції р53.

Без прив'язування до конкретної теорії, інгібітор PNP може викликати підвищення 2'-дезоксигуанозин (dGuo) у плазмі та накопичення внутрішньоклітинного дезоксигуанозин трифосфату (dGTP), що викликає відмирання клітин. Необмежувальними прикладами інгібіторів PNP можуть бути ті, що описуються у патентах США №№ 4,985,433; 4,985,434, 5,008,265; 5,008,270; 5,565,463 та 5,721,240, виданих BioCryst Pharmaceuticals, Inc., зміст яких включено до цього опису шляхом посилання. У деяких варіантах втілення інгібітором PNP є Фородезин або його сіль, включаючи сіль з HCl:



Без прив'язування до конкретної теорії, алкілюючий агент означає хіміотерапевтичну сполуку, яка хімічно модифікує ДНК і порушує його функцію. Деякі алкілюючі агенти викликають утворення перехресних зв'язків між нуклеотидами на одному ланцюгу або на комплементарному ланцюгу молекули дволанцюгової ДНК, а інші викликають невідповідність пар основ між ланцюгами ДНК. Алкілюючим агентом може бути похідна гірчиці, похідна нітрозосечовини, платинова сполука або імідазол-карбоксамідна сполука. Прикладами алкілюючих агентів є Бендамустин, Бусульфан, Карбоплатин, Кармустин, Цисплатин, Хлорамбуцил, Циклофосфамід, Дакарбазин, Гексаметилмеламін, Іфосфамід, Ломустин, Хлорметин, Мелфалан, Мітотан, Мітоміцин, Піпоброман, Прокарбазин, Стрептозоцин, Тіотеп та Триетилмеламін. У деяких випадках алкілюючим агентом може



Агентом проти CD20 може бути будь-який агент, який є спрямованим (наприклад, вибірково зв'язується) на білок клітинної поверхні В-клітин CD20. У деяких варіантах втілення агентом проти CD20 є антитіло, специфічне до CD20. Без прив'язування до конкретної теорії вважається, що ці агенти можуть діяти через один з трьох механізмів: (1) комплементзалежну цитотоксичність; (2) антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність; та (3) викликання апоптозу. Прикладами агентів проти CD20 є Ритуксимаб, Ірбітумаб, Трастузумаб, Гемтузумаб та Алемтузумаб. У деяких варіантах втілення агентом проти CD20 є Ритуксимаб.

Інгібітор PNP, алкілюючий агент, та/або агент проти CD20 можуть вводитися будь-яким шляхом, наприклад, інтраопераційним, інтратекальним, інтрадискальним, перидискальним, епідуральним (включаючи перирадикулярний та трансфорамінальний), за допомогою будь-якої комбінації інтрадискального, епідурального та перидурального, периспінального, внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, перорального, інтраназального, інгаляційного, кризьшкірного та парентерального шляхів.

Інгібітор PNP, алкілюючий агент та/або агент проти CD20 можуть бути рецептовані з фармацевтично прийнятним носієм, вибраним залежно від вибраного шляху введення та стандартної фармацевтичної практики. Інгібітор PNP, алкілюючий агент та/або агент проти CD20 можуть бути рецептовані у дозовані форми згідно зі стандартною практикою у галузі приготування фармацевтичних композицій. Див. Alphonso Gennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA. Прийнятними дозованими формами можуть бути, наприклад, таблетки, капсули, розчини, парентеральні розчини, пастилки, супозиторії або суспензії.

Для парентерального введення, інгібітор PNP, алкілюючий агент та/або агент проти CD20 можуть бути змішані з прийнятним носієм або розріджувачем, таким, як вода, олія (зокрема, рослинна олія), етанол, сольовий розчин, водна декстроза (глюкоза) та подібні цукрові розчини, гліцерин або гліколь, такий як пропіленгліколь або поліетиленгліколь. Розчини для парентерального введення в оптимальному варіанті містять водорозчинну сіль інгібітору PNP, алкілюючий агент та/або агент проти CD20. Також можуть додаватися стабілізатори, антиоксиданти та консерванти. Прийнятними антиоксидантами є сульфід, аскорбінова кислота, лимонна кислота та її солі та натрієва сіль EDTA. Прийнятними консервантами є бензалконій хлорид, метил- або пропілпарабен та хлорбутанол. Композиція для парентерального введення може набувати форми водного або неводного розчину, дисперсії, суспензії або емульсії.

Для перорального введення інгібітор PNP, алкілюючий агент та/або агент проти CD20 може комбінуватися з одним або кількома твердими неактивними інгредієнтами для виготовлення таблеток, капсул, пігулок, порошків, гранул або інших прийнятних дозованих форм для перорального введення. Наприклад, інгібітор PNP, алкілюючий агент та/або агент проти CD20 можуть комбінуватися з принаймні одним формоутворювачем, таким, як наповнювачі, зв'язувальні речовини, гіроскопічні речовини, дезінтегратори, уповільнювачі розчинення, прискорювачі абсорбції, зволожувачі, абсорбенти або мастила.

Конкретна доза інгібітору PNP, алкілюючого агента та/або агента проти CD20, звичайно, визначається конкретними обставинами для індивідуального пацієнта, включаючи розмір, масу, вік та стать пацієнта, характер та стадію захворювання, що підлягає лікуванню, та агресивність хвороби, а також шляхом введення сполуки. Дози та режим введення сполук, наприклад, фородезину, бендамустину та ритуксимабу, передбачають введення окремо або у комбінації, наприклад, згідно з дозами та режимом, вказаними у затверджених Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) інструкціях із застосування.

У деяких варіантах втілення інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять одночасно, а в інших варіантах втілення інгібітор PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять послідовно. В одному варіанті втілення алкілюючий агент або агент проти CD20 вводять один або кілька разів перед введенням інгібітору PNP (наприклад, двічі, тричі, чотири рази, п'ять разів, 10 разів або 20 разів). В іншому варіанті втілення інгібітор PNP може вводитись один або кілька разів перед введенням алкілюючого агента або агента проти CD20 (наприклад, двічі, тричі, чотири рази, п'ять разів, 10 разів або 20 разів).

У деяких варіантах втілення лікування раку кровотворної системи у суб'єкта може включати визначення суб'єкта з резистентністю до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів. Однією з головних причин невдалого лікування раку є розвиток резистентності ракових клітин до ліків. Це є дуже серйозною проблемою, що може призводити до рецидивів хвороби або навіть смерті. В одному варіанті втілення суб'єкт з резистентністю до одного або кількох хіміотерапевтичних засобів може бути визначений з застосуванням відомих спеціалістам способів. Суб'єкт може бути резистентним до будь-яких відомих хіміотерапевтичних засобів. У деяких варіантах втілення суб'єкт може бути резистентним до алкілюючого агента (наприклад, Бендамустину) та/або аналога пуриннуклеозиду (наприклад, Флударабіну).

Після визначення резистентного до хіміотерапії суб'єкта цьому суб'єктові вводять інгібітор PNP. У деяких варіантах втілення інгібітором PNP є Фородезин HCl.

В іншому варіанті втілення лікування раку кровотворної системи у суб'єкта може включати виявлення наявності делеції р53, наприклад, делеції 17p, в одній або кількох ракових клітинах у зразку, взятому з організму суб'єкта. Делеція 17p є ознакою, що допомагає розпізнати суб'єкта з раком кровотворної системи, який може демонструвати іншу біологічну та клінічну поведінку.

Наприклад, зміни p53 можуть призводити до резистентності до ліків та скорочення періоду виживання.

В одному варіанті втілення суб'єктові з делецією p53 вводять інгібітор PNP. У деяких варіантах втілення інгібітором PNP є Фородезин HCl.

5 Способи лікування, які обговорювалися вище, включають як монотерапію, так і комбіновану терапію. У контексті комбінованої терапії винахід передбачає введення двох або більшої кількості хіміотерапевтичних засобів, зокрема, інгібітору PNP та алкілюючого агента або інгібітору PNP та агента проти CD20. Деякі з цих сполук вже було затверджено для застосування у лікуванні одного або кількох ракових показань. Інші перебувають на різних

10 стадіях доклінічних та клінічних досліджень.
У деяких варіантах втілення введення інгібітору PNP та алкілюючий агент або агент проти CD20 можуть створювати синергетичний ефект. Цей ефект може бути продемонстрований через розвиток комбінаційного індексу (CI). У деяких варіантах втілення цей індекс розраховують залежно від частки уражених клітин згідно з процедурою Chou et al., *Advance Enz. Regul.*, 22, 27-55 (1985). Цей тест є загальновідомим і передбачає оцінку коефіцієнтної взаємодії для різних пропорцій відмирання клітин. Наприклад, якщо результатом лікування медикаментом А є 30 % відмирання клітин, а результатом лікування медикаментом В - 50 % відмирання клітин, то мало б очікуватися, що комбінація двох медикаментів в результаті забезпечуватиме 65 % відмирання клітин. Відповідно, якщо співвідношення прогнозованого відмирання клітин з фактично виміряним після застосування комбінації медикаментів є меншим за одиницю, це означає, що спостерігається синергетичний ефект. Якщо ж це співвідношення є більшим за одиницю, це означає, що спостерігається антагоністичний. В одному варіанті втілення комбінація Фородезину та Бендамустину демонструє синергетичний ефект, а комбінація Фородезину та Флударабіну демонструє антагоністичний ефект (див. Приклад 5).

25 В. Фармацевтичні композиції

Авторами пропонуються фармацевтичні композиції, які включають інгібітор PNP та алкілюючий агент або інгібітор PNP та агент проти CD20. У деяких варіантах втілення інгібітор PNP може включати Фородезин (BCX-1777). У деяких варіантах втілення алкілюючий агент може включати Бендамустин. В інших варіантах втілення агентом проти CD20 є Ритуксимаб.

30 Фармацевтичні композиції, які забезпечуються даним винаходом, містять інгібітор PNP та алкілюючий агент або інгібітор PNP та агент проти CD20 у кількості, яка є корисною для лікування різних видів раку кровотворної системи, та фармацевтично прийнятний носій. До фармацевтичних носіїв, прийнятних для введення сполук, які забезпечуються даним винаходом, належать будь-які носії, відомі спеціалістам у даній галузі як прийнятні для конкретного режиму введення.

35 Композиції в одному варіанті втілення можуть бути рецептовані у прийнятні фармацевтичні композиції, такі, як розчини, суспензії, таблетки, дисперговані таблетки, пігулки, капсули, порошки, композиції уповільненого вивільнення або еліксири для перорального введення, або стерильні розчини або суспензії для парентерального введення, а також у формі кризьшкірних пластрів та сухих порошкових інгаляторів (див., наприклад, *Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, Fourth Edition 1985, 126).

Концентрація інгібітору PNP та алкілюючого агента або інгібітору PNP та агента проти CD20 у фармацевтичній композиції залежить від швидкості абсорбції, інактивації та екскреції сполук, фізико-хімічних характеристик сполук, схеми застосування та кількості, яка має вводиться, а також інших чинників, відомих спеціалістам у даній галузі. Наприклад, доставлена кількість є достатньою для лікування хронічного лімфоцитарного лейкозу, як описано авторами.

45 Фармацевтична композиція може вводиться за один раз або може бути розділена на кілька менших доз, які призначаються для введення з певними інтервалами часу. Слід розуміти, що точна доза та тривалість лікування залежать від хвороби, яка підлягає лікуванню, і може визначатися емпірично з застосуванням відомих протоколів випробування або шляхом екстраполяції даних *in vivo* або *in vitro* випробувань. Слід зазначити, що значення концентрації та дози також можуть змінюватися залежно від тяжкості стану, який підлягає лікуванню. Також слід розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта конкретні режими дозування з часом мають регулюватися згідно з індивідуальною потребою та професійною точкою зору особи, яка вводить або спостерігає за введенням композицій, і що вказані авторами межі концентрації подаються лише для прикладу і не є обмежувальними для обсягу або практичного втілення заявлених композицій.

60 Фармацевтичні композиції передбачаються для введення людині та тваринам у дозованих лікарських формах, таких, як таблетки, капсули, пігулки, порошки, гранули, стерильні парентеральні розчини або суспензії, а також пероральні розчини або суспензії та емульсії "олія

у воді", які містять відповідну кількість сполук або їх фармацевтично прийнятних похідних. Терапевтично активні фармацевтичні сполуки та їх похідні в одному варіанті втілення рецептують і вводять у дозованих лікарських формах або багаторазових дозованих формах. У контексті даного опису дозовані лікарські форми означають фізично окремі одиниці, придатні для введення людині та тваринам, і окремо упаковані у спосіб, відомий спеціалістам у даній галузі. Кожна одинична доза містить задану кількість терапевтично активної сполуки, достатню для створення потрібного терапевтичного ефекту, разом з необхідним фармацевтичним носієм, наповнювачем або розріджувачем. Прикладами дозованих лікарських форм є ампули та шприці, а також окремо упаковані таблетки або капсули. Дозовані лікарські форми можуть вводитися частками або кратними дозами. Багаторазова дозована форма являє собою кілька ідентичних дозованих лікарських форм, упакованих в одне вмістище, для введення окремими дозованими лікарськими формами. Прикладами багаторазових дозованих форм є флакони, пляшки з таблетками або капсулами або пляшки об'ємом у пінту або галон. Таким чином, багаторазова дозована форма являє собою певну кількість одиничних доз, які не є відокремленими в упаковці.

Придатні для введення рідкі фармацевтичні композиції приготують, наприклад, шляхом розчинення, диспергування або змішування в інший спосіб активної сполуки, як визначено вище, та необов'язкових фармацевтичних ад'ювантів у носії, такому, як, наприклад, вода, сольовий розчин, водна декстроза, гліцерин, гліколі, етанол і т. ін., для утворення розчину або суспензії. У разі потреби призначена для введення фармацевтична композиція також може включати малу кількість нетоксичних допоміжних речовин, таких, як зволожувачі, емульгатори, солюбілізатори, рН буферні агенти і т.ін., наприклад, ацетат, цитрат натрію, похідні циклодекстрину, сорбітанмонолаурат, триетаноламін, ацетат натрію, олеат триетаноламіну та інші подібні агенти.

Конкретні способи приготування дозованих форм є відомими або стануть зрозумілими спеціалістам у даній галузі; див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975.

Можуть бути виготовлені дозовані форми або композиції, які містять інгібітор PNP та алкілюючий агент або інгібітор PNP та агент проти CD20 у межах від 0,005 % до 100 % та решту, яку складає нетоксичний носій. Способи виготовлення цих композицій є відомими спеціалістам у даній галузі. Передбачені композиції можуть містити 0,001-100 % активного інгредієнта, в одному варіанті втілення - 0,1-95 %, в іншому варіанті втілення - 75-85 %.

C. Комплекти

Авторами також пропонується комплекти. Зазвичай комплект включає інгібітор PNP та алкілюючий агент або інгібітор PNP та агент проти CD20. У деяких варіантах втілення комплект може включати одну або кілька систем доставлення, наприклад, для інгібітору PNP, алкілюючого агента, агента проти CD20 або будь-якої їх комбінації, а також інструкції з користування комплектом (наприклад, інструкції з лікування суб'єкта).

У деяких варіантах втілення комплект може включати інгібітор PNP та/або алкілюючий агент. В іншому варіанті втілення комплект може включати інгібітор PNP та/або агент проти CD20. У деяких варіантах втілення комплект може включати інгібітор PNP та ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення суб'єктові з резистентністю до алкілюючих агентів, таких, як Бендамустин. В іншому варіанті втілення комплект може включати інгібітор PNP та ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення суб'єктові з делецією p53 (наприклад, делецією 17p). В іншому варіанті втілення комплект може включати інгібітор PNP та ярлик, на якому вказується, що вміст призначається для введення з алкілюючим агентом або агентом проти CD20.

D. Визначення

У контексті даного опису форми однини також передбачають посилання на форми множини, якщо прямо не вказується іншого.

Вираз "ефективна кількість", вжитий для опису кількості сполуку згідно зі способом, означає кількість сполуки, яка дозволяє досягати потрібного фармакологічного ефекту або іншого ефекту, наприклад, кількість, яка інгібує ненормальний ріст або проліферацію, або викликає апоптоз ракових клітин, що в результаті забезпечує корисний ефект.

Термін "лікування" означає викликання терапевтично сприятливого ефекту, такого, як послаблення існуючих симптомів, запобігання додатковим симптомам, послаблення або уникнення метаболічних причин, які лежать в основі симптомів, затримка або запобігання подальшому розвитку порушення та/або зменшення тяжкості симптомів, які мають або можуть розвинути.

Приклади

Приклад 1: Цитотоксичність Фородезину у CLL-ZAP-70^{high} порівняно з ZAP-70^{low}

Клітини з 16 пацієнтів з CLL з високим рівнем ZAP-70 (>20 %) і з 13 пацієнтів з CLL з низьким рівнем ZAP-70 (<20 %) обробляли при 2 мкМ фородезину + dGuo 20 мкМ протягом 48 годин. Цитотоксичність (виражену як відсоток від показника контрольних, необроблених клітин) аналізували шляхом забарвлення AnnexinV-FITC. Результати показали, що середня цитотоксичність для високого та низького рівня ZAP-70 була більшою за 50 % (див. Фіг. 1A та 1B).

Приклад 2: Внутрішньоклітинне підвищення рівня dGTP

Клітини з 26 пацієнтів з CLL обробляли Фородезином протягом 20 годин. Усі нуклеотиди екстрагували (60 % метанол) і рівень dGTP кількісно визначали шляхом аналізу з застосуванням ДНК полімерази. Життєздатність клітин порівняно з контрольним показником (необроблені клітини) аналізували через 48 годин шляхом забарвлення Annexin V-FITC. Внутрішньоклітинне підвищення рівня dGTP після лікування Фородезином добре корелюється з викликанням відмирання клітин (див. Фіг. 2).

Приклад 3: Реакція на Фородезин у випадках CLL з делецією p53

Клітини з 11 пацієнтів з CLL з делеціями 17p (g =>85 % клітин, аналіз FISH) обробляли при 2 мкМ фородезину + 20 мкМ dGuo, 25 мкМ Бендамустину або 1 мкг/мл Флударабіну протягом 48 годин. Результати показали, що у випадках CLL з делецією p53 спостерігалася висока реакція на Фородезин (див. Фіг. 3).

Приклад 4: Вплив Фородезину у випадках CLL з хіміотерапевтичною резистентністю

Клітини з пацієнтів з CLL, у яких було виявлено низьку чутливість або відсутність чутливості до Бендамустину або Флударабіну, обробляли при 2 мкМ фородезину та 10-20 мкМ dGuo. Результати показали, ці клітини демонструють добру реакцію на обробку Фородезином (див. Фіг. 4).

Приклад 5: Вплив комбінацій Фородезину/Бендамустину та Фородезину/Флударабіну

Клітини з пацієнтів з CLL обробляли при 2 мкМ фородезину + 10-20 мкМ dGuo і 10-25 мкМ Бендамустину або 3,75-7,5 мкМ Флударабіну протягом 48 годин. Комбінаційний індекс (CI) аналізували після 48 годин. Значення CI, нижче за 1, свідчить про синергетичний ефект (алгоритм Chour & Talalay), а значення CI, більше за 1, свідчить про антагоністичний ефект. Результати показали, що Фородезин/Бендамустин мають синергетичний ефект, а Фородезин/Флударабін мають антагоністичний ефект (див. Фіг. 5A та 5B).

Приклад 6: Вплив комбінації Фородезину/Ритуксимабу

Клітини з 7 пацієнтів з CLL (3 з високим рівнем ZAP-70 (>35 %) і 4 з делецією p53s) обробляли 2 мкМ Фородезину HCl+10-20 мкМ dGuo та 25-50 мкМ Ритуксимабу протягом 24-48 годин. Комбінаційний індекс (CI) аналізували після 48 годин. Клітини піддавали аналізу шляхом проточної цитометрії з застосуванням аналізів з забарвленням Annexin V-FITC та PI-проникності. Значення CI, менше за 1, свідчить про синергетичний ефект (алгоритм Chour & Talalay), а значення CI, більше за 1, свідчить про антагоністичний ефект. Результати показали, що комбінація Фородезину/Ритуксимабу має синергетичний ефект (див. Фіг. 6).

Приклад 7: Фородезин викликає p53-незалежний мітохондріальний апоптоз

Як описано авторами, інгібітор пуриннуклеозидфосфорилази фородезин викликає p53-незалежний мітохондріальний апоптоз у клітинах хронічного лімфоцитарного лейкозу через знижувальну регуляцію Mcl-1 та індукцію p73 та Bim.

Хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL) є клінічною гетерогенною формою, яка виникає через моноклональне розширення довговічних CD5⁺ B-лімфоцитів з ненормальною регуляцією апоптозу та низькими показниками проліферації. Незважаючи на прогрес, досягнутий останнім часом, нові засоби терапії при лікуванні CLL не поліпшили загальну виживаність пацієнтів, і зрештою у багатьох пацієнтів розвинулася резистентність до ліків. Немутований профіль генів імунoglobulinів, висока експресія білка ZAP-70, висока експресія CD38 та наявність певних цитогенетичних відхилень (зокрема, делецій 17p13 (TP53) та 11q22-q23 (ATM)) є пов'язаними з погіршенням загальної виживаності та скороченням часу до прогресування хвороби у пацієнтів з CLL. Хіміотерапевтичні протиракові медикаменти викликають апоптоз, як правило, або через реакцію на пошкодження ДНК та активацію p53 і/або безпосередньо через порушення мітохондріальної функції. Очевидно, шлях реакції на пошкодження ДНК відіграє ключову роль у викликаному медикаментом апоптозі CLL, оскільки клітини з пацієнтів з CLL з відхиленнями TP53 виявляють резистентність до традиційної хіміотерапії та короткий період виживання. Брак функції p53 через делецію p53 та мутація алеля, що залишився, збільшує резистентність пацієнта з CLL до хіміотерапії, створюючи "подвійний удар" під час набуття резистентності до ліків, що усуває транскрипційну та мітохондріальну апоптичну активність p53. Таким чином, нові

ефективні способи мають викликати апоптоз через незалежні від пошкодження ДНК шляхи та/або пряму активацію апоптичних шляхів незалежно від p53.

Ознакою клітин CLL є їхня стійкість до викликання апоптозу через білки групи Bcl-2, які є ключовими регуляторами апоптозу та виживання у клітинах CLL. Високий рівень антиапоптичних білків Bcl-2 та Mcl-1 є пов'язаним з агресивною хворобою та резистентністю до хіміотерапії у CLL. MCL-1 також відіграє важливу роль у подовженні періоду виживання клітин CLL, оскільки рівень MCL-1 обернено корелюється з *in vitro* та клінічною реакцією на різні медикаменти.

Пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP) є ферментом у шляху реутилізації пурину, який фосфорилує аналоги пурину до їх відповідних основ та дезоксирибоза-фосфату. Форорезин або імуцилін Н (BCX-1777) є ефективним перехідним аналогом інгібітору PNP, який продемонстрував інгібування проліферації Т-клітин *in vitro* та *in vivo*; див. Bantia et al., *Int Immunopharmacol*, 1 (6), 1199-210 (2001); Kicska et al., *PNAS*, 98(8), 4593-4598 (2001); Bantia et al., *Int Immunopharmacol*, 3(6), 879-887 (2003); та Gandhi et al., *Semin Oncol*, 34 (6 Suppl 5), S8-12 (2007)). Форорезин продемонстрував низький профіль токсичності (Gandhi et al., *Blood*, 106 (13), 4253-4260 (2005); та Korycka et al., *Mini Rev Med Chem*, 7 (9), 976-983 (2007)) і досліджується у клінічних випробуваннях пацієнтів з Т-клітинним пролімфоцитарним лейкозом, шкірною Т-клітинною лімфомою та В-клітинним гострим лімфобластним лейкозом (Galmarini et al., *IDrugs*, 9 (10), 712-722 (2006)). Крім того, форорезин створює *ex vivo* цитотоксичний ефект у клітинах CLL (Balakrishnan et al., *Blood*, 108 (7), 2392-2398 (2006)). Інгібування PNP в результаті веде до підвищення у плазмі рівня 2'-дезоксигуанозину (dGuo) з наступним внутрішньоклітинним накопиченням дезоксигуанозин трифосфату (dGTP) у клітинах з високим рівнем активності дезоксинуклеозидкінази, що призводить до викликання апоптозу у Т-лімфоцитах. Клітини CLL мають високу активність (dCK), який є первинним ферментом для перетворення dGuo на dGMP, який потім перетворюється на dGTP, через сприйнятливості клітин CLL до інгібування PNP. На відміну від інших аналогів пуриннуклеозиду, таких, як флударабін або бендамустин, форорезин не включається до ДНК і являє собою новий клас вибірових протипухлинних агентів з новим і повністю не з'ясованим механізмом дії.

Як описано авторами, оцінювався цитотоксичний вплив Форорезину у первинних лейкозних клітинах 43-х пацієнтів з CLL, а також підвищення *in vitro* комбінації форорезину з медикаментами, які застосовують у клінічній практиці, такими, як флударабін, бендамустин та ритуксимаб. На основі цих результатів, форорезин виявляється високоефективним терапевтичним засобом у лікуванні пацієнтів з CLL незалежно від їх стану ZAP-70, CD38, p53 або цитогенетичних відхилень. Крім того, було виявлено, що форорезин викликає активацію мітохондріального апоптичного шляху шляхом зниження рівня білка Mcl-1 та індукції p73 та проапоптичного білка Bim. Цікавим є те, що не спостерігалось значних розбіжностей у цих апоптичних маркерах залежно від стану p53, що свідчить про спільний апоптичний шлях, незалежний опосередкованого p53 відмирання клітин.

Форорезин викликає апоптоз у первинних клітинах пацієнтів з CLL незалежно від ZAP-70, CD38 та цитогенетичного статусу.

Дослідження з підвищенням дози здійснювали для оцінки *in vitro* цитотоксичності Форорезину у первинних лейкозних лімфоцитах пацієнтів з CLL. Для досягнення *in vitro* цитотоксичного ефекту додавали зовнішнє джерело dGuo разом з форорезином. Інкубація клітин CLL з фармакологічно досяжним рівнем форорезину (2-5-10 мкМ) при підвищенні доз dGuo (10-20 або 30 мкМ) протягом 48 годин викликала відмирання клітин (аналіз шляхом забарвлення Annexin-V+), тоді, як форорезин або dGuo окремо не викликали цитотоксичного ефекту. Не спостерігалось розбіжностей у відмиранні клітин при застосуванні вищих доз форорезину (навіть до 15 мкМ). Натомість підвищення дози dGuo в результаті збільшувало викликання відмирання клітин, тому наступні дослідження здійснювали з застосуванням

одиночної дози форорезину (2 мкМ) разом з 10 або 20 мкМ dGuo.

Крім того, цитотоксичний вплив Форорезину та dGuo піддавали аналізу у первинних лейкозних клітинах 43 пацієнтів з CLL. Спостерігалась середня цитотоксичність відносно контрольного зразка $44,2 \% \pm 11,4$ і $57,4 \% \pm 13,1$ через 24 год. і 48 год., відповідно. Цитотоксичний ефект був вищим за 60 % у 21 випадку (48,8 % від загальної кількості), 40-60 % у 18 випадках (41,8 % від загальної кількості) і нижчим за 40 % лише у 4 випадках (9,4 % від загальної кількості). Не спостерігалось розбіжностей у відмиранні клітин між застосуванням підданих кріоконсервації первинних зразків CLL ($n=32$, $58,3 \% \pm 11$ через 48 годин) та свіжих зразків CLL ($n=10$, $56,6 \% \pm 6,4$ через 48 годин). Цитотоксичність 2 мкМ форорезину та dGuo (10-20 мкМ) у PBMC здорових донорів була відносно низькою порівняно з клітинами CLL, як у Т-лімфоцитах (клітини CD3⁺), так і у В-лімфоцитах (клітини CD19⁺).

У пацієнтів з CLL рівень експресії білків ZAP-70 та/або CD38 є пов'язаним з гіршою загальною виживаністю та коротшим часом до прогресування хвороби (Hus et al, Ann Oncol, 17 (4), 683-690 (2006)). Не спостерігалось значних розбіжностей між відмиранням клітин, викликаним флудезином у клітинах CLL з низьким рівнем ZAP-70 (17 пацієнти з CLL; $58,1\% \pm 11$ середньої цитотоксичності відносно контролю) та клітинах CLL, які експресують високий рівень ZAP-70 (22 пацієнти з CLL; $57,9\% \pm 12$ середньої цитотоксичності), а також у рівні експресії CD38 (CD38 низьк. $52,3\% \pm 12$ порівняно з CD38 висок. $62,1\% \pm 12$ середньої цитотоксичності). Крім того, найбільш часті цитогенетичні зміни у клітинах CLL, такі, як делеція 13q, делеція 11q та делеція 17p, пов'язані з *in vitro* та *in vivo* резистентністю до ліків та коротким терміном виживання пацієнтів з CLL, не корелювалися з викликанню флудезином цитотоксичністю, і в цих випадках також досягалася належна реакція.

Також порівнювали цитотоксичну реакцію клітин CLL, оброблених флудезином, порівняно з цитотоксичністю при застосуванні флударабіну або бендамустину, двох головних хіміотерапевтичних засобів, які застосовують при CLL (Aivado et al, Semin Oncol, 29, (4 Suppl 13), 19-22 (2002); та Montserrat, Hematol J, 5, Suppl 1, S2-S9 (2004)). Первинні клітини CLL з 32 пацієнтів з CLL, 11 з яких з делецією p53s, інкубували при 2 мкМ флудезину та 20 мкМ dGuo, 10-25 мкМ бендамустину та 1 мкг/мл флударабіну протягом 48 годин, окремо або у комбінації. При застосуванні окремих агентів середня цитотоксичність у CLL без делеції 17p становила $55,3 \pm 8$, $50,6 \pm 11$ і $49,2 \pm 18$ для флудезину, флударабіну та бендамустину, відповідно. Досягнення делеції 17p, що веде до змін p53, є пов'язаним з *in vitro* та *in vivo* резистентністю до флударабіну у пацієнтів з CLL (Dohner et al., Blood, 85 (6), 1580-1589 (1995); та Turgut et al, Leuk Lymphoma, 48 (2), 311-320 (2007)). Показовим є те, що більшість пацієнтів з CLL з делецією 17p не виявляли реакції на флудезин, з середньою цитотоксичністю через 48 годин $60,1\% \pm 21$ (2 мкМ флудезину та 20 мкМ dGuo). Натомість у цих випадках було виявлено нижчу реакцію на флударабін ($25,1 \pm 13$ середньої цитотоксичності) та бендамустин ($36,2\% \pm 17$ середньої цитотоксичності). Крім того, у 12 з 32 підданих аналізу зразків, взятих у пацієнтів з CLL, не спостерігали або спостерігали низьку *in vitro* реакцію (цитотоксичність, нижча за 35% відносно контролю) на 25 мкМ бендамустину та/або 1 мкг/мл флударабіну, але у них виявлялася висока реакція на флудезин. У трьох випадках з делецією 17p з низькою або дуже низькою реакцією на бендамустин або флударабін було продемонстровано високу реакцію на флудезин ($67\% \pm 20$ середньої цитотоксичності), і лише два пацієнти з CLL продемонстрували низьку реакцію на флудезин.

Комбінації флудезину з флударабіном, бендамустином та ритуксимабом.

Досліджували комбінацію флударабіну з флудезином, призначену для лікування. Також досліджували комбінацію флудезину з бендамустином, алкілюючим агентом, а також пуриноподібним аналогом. Комбінації 2 мкМ флудезину та dGuo (10-20 мкМ) з флударабіном (0,5-1 мкг/мл) не збільшувала цитотоксичний ефект будь-якого медикаменту як окремого агента, і спостерігався негативний вплив на викликання відмирання клітин. Для оцінки комбінованого ефекту між двома медикаментами розраховували комбінаційний індекс або значення CI за допомогою алгоритму Chou and Talalay (Chou et al, Adv Enzyme Regul, 22, 27-55 (1984)) як відмітну ознаку для антагоністичного або синергетичного ефекту для комбінації двох різних медикаментів. Тобто, значення CI, вище за 1, свідчить про антагоністичний ефект, а значення CI, нижче за 1, свідчить про синергетичний ефект. Комбіновані дослідження, які здійснювали з флударабіном та флудезином, продемонстрували значення CI, вищі за 1, в усіх проаналізованих випадках CLL (48 годин), що свідчило про антагоністичний ефект між обома медикаментами. Середня цитотоксичність, яка досягалася при застосуванні комбінації флудезину та флударабіну, була нижчою за ту, що викликала обома медикаментами. Флудезин також був ефективним у випадках CLL з низькою реакцією на бендамустин, але, на відміну від флударабіну, значне збільшення відмирання клітин спостерігалось при комбінації бендамустину та флудезину, і спостерігався сильний синергетичний ефект (СК1). Флудезин явно посилює цитотоксичну реакцію низької дози бендамустину (10 мкМ, середня цитотоксичність 32,95%) з досягненням середнього цитотоксичного ефекту для комбінації двох медикаментів 70,5%.

Також досліджували комбінацію Флудезину та Ритуксимабу, гуманізованого моноклонального антитіла проти CD20. Через 24 години відмирання клітин, яке спостерігалось при застосуванні ритуксимабу (25-50 мкг/мл) як окремого агента, було низьким, і комбінація з флудезином явно поліпшувала цитотоксичний ефект обох медикаментів. Також було продемонстровано сильний синергетичний ефект між ритуксимабом та флудезином зі значеннями CI, наближеними до 0,5.

Кореляція підвищення внутрішньоклітинного рівня dGTP та фосфорилювання dCK у Ser-74 з викликаним фородезином відмиранням клітин.

Внутрішньоклітинний рівень dGTP у первинних клітинах 26 пацієнтів з CLL, оброблених 2 мкМ фородезину та 10 мкМ dGuo, піддавали аналізу. Спостерігалася явна пряма кореляція (p<0,05) між кратним підвищенням рівня dGTP, який аналізували через 18 годин, та цитотоксичністю фородезину через 48 годин. Фородезин викликав значне підвищення внутрішньоклітинного рівня dGTP (підвищення до 96 разів відносно контрольних базових рівнів з досягненням значень від 6 до 129 пмоль dGTP/10⁶ млн. клітин). У чотирьох випадках CLL було продемонстровано відсутність підвищення або незначне підвищення рівня dGTP, і у цих випадках спостерігалася низька цитотоксична реакція на фородезин. Для підтвердження того, що підвищення рівня dGTP після лікування Фородезином опосередковується фосфорилюванням dGuo через dCK, аналізували викликання відмирання клітин у присутності дезоксицитидину. Оскільки дезоксицитидин є первинним субстратом dCK, він має інгібувати фосфорилювання dGuo через dCK, впливаючи на внутрішньоклітинне підвищення dGTP та наступний апоптоз, викликаний фородезином. Попередня інкубація клітин з дезоксицитидином (5-10 мкМ) інгібувала викликане фородезином відмирання клітин. Деякі нуклеозидні аналоги, які застосовують у протираковій хіміотерапії, зокрема, аналог пурину флударабін та аналог дезоксицитидину гемцитабін, фосфорилюються dCK з метою їх активації. Дезоксицитидин також усуває втрату життєздатності клітин, викликану флударабіном, тоді, як відмирання клітин, викликане бендамустином (медикаментом, який може діяти незалежно від dCK), не усувається.

Стан фосфорилювання dCK аналізували шляхом вестерн-блотингу після обробки фородезином, оскільки раніше було описано, що у клітинах CLL активність dCK позитивно регулюється фосфорилюванням у Ser-74 (Smal et al., J Biol Chem, 281 (8), 4887-4893 (2006); Smal et al, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 25(9-11), 1141-1146 (2006); Smal et al, Cancer Lett, 253(1), 68-73 (2007)). Спостерігалася підвищення фосфорилюваної форми (у Ser-74) dCK. у клітинах CLL, підвищення, не зумовлене бендамустином. Здійснювали денситометричний аналіз співвідношення фосфо-dCK/dCK після обробки Фородезином і спостерігали кореляцію з цитотоксичністю через 24 (p=0,05, додаткові дані) та 48 годин (p=0,05).

З метою дослідження антагоністичного ефекту, який спостерігався між флударабіном та фородезином, спостерігали внутрішньоклітинне підвищення dGTP після інкубації клітин CLL з флударабіном (1 мкг/мл) та фородезином (2 мкМ та 10 мкМ dGuo). Флударабін окремо не викликав підвищення рівня dGTP, тоді, як комбінація флударабіну з фородезином (сірі стовпчики) знижувала кратне підвищення dGTP, зумовлене лише фородезином (чорні стовпчики). Таким чином, зменшення підвищення dGTP, яке спостерігалася при застосуванні комбінації флударабіну та фородезину, пояснює антагоністичний ефект, який спостерігається між двома медикаментами. Оскільки флударабін для активності потребує фосфорилювання dCK, і dGuo також фосфорилюється цим ферментом, два медикаменти можуть конкурувати за один фермент, і, таким чином, утворення dGTP або активної форми флударабіну має знижуватися.

Фородезин викликає активацію мітохондріального апоптичного шляху незалежно від p53.

Для пояснення механізму дії, через який фородезин викликає апоптоз у клітинах CLL, деякі ознаки мітохондріального апоптичного шляху піддавали аналізу. Фородезин викликав втрату мітохондріального трансмембранного потенціалу ($\Delta\psi_m$) на ранніх стадіях. Активні форми кисню (ROS) можуть вироблятися після мітохондріального пошкодження і згодом можуть опосередковувати апоптоз (Villamor et al, Curr Pharm Des, 10 (8), 841-853 (2004)). Фородезин також викликав вироблення ROS у первинних клітинах CLL. Мітохондріальна деполяризація та вироблення ROS спостерігалися як ранні події, оскільки вони виявлялися після 10 годин обробки фородезином. Окиснювальний стрес відіграє роль у регулюванні запрограмованого відмирання клітин, тому аналізу піддавали вплив деяких акцепторів ROS. Попередня інкубація клітин CLL з відновленим глутатіоном (GSH), N-ацетилцистеїном (NAC) або Tiron знижувала втрату $\Delta\psi_m$ та вироблення ROS, викликані фородезином. NAC та Tiron (специфічні акцептори O₂) практично припиняли вироблення ROS, тоді, як вплив GSH, акцептора, селективного для H₂O₂, був уповільненим.

Згідно з попереднім *in vitro* дослідженням у клітинах CLL, фородезин в результаті веде до стабілізації p53 та викликання апоптозу (Balakrishnan et al, Blood, 108 (7), 2392-2398 (2006)), і ці результати відповідають іншим протираковим медикаментам, які викликають пошкодження ДНК та опосередкований p53 апоптоз. Але, на відміну від інших аналогів пуриннуклеозиду, фородезин не є включеним до ДНК. Цікавим є те, що ранні ознаки підданого аналізу мітохондріального апоптичного шляху також спостерігалися у пацієнтів з CLL з делецією 17p

(p53) або делецією 11q (ATM), що свідчило про механізм викликання апоптозу незалежно від опосередкованої p53 реакції на пошкодження ДНК.

Фородезин започатковує послідовну активацію каспази-9 та -8 і обробку BID, що свідчить про роль петлі посилення мітохондріального апоптичного шляху, що опосередковується каспазою-8.

З метою дослідження наступних шляхів сигналу, які ведуть до мітохондріального апоптозу, було досліджено характер активації каспази після дії фородезину. Залежну від дози та часу активацію каспази-9, -8 та -3 спостерігали й аналізували шляхом обробки їх про-неактивної форми. Продукти розщеплення прокаспази-9 та -8 були присутніми майже одночасно вже через 10 годин після обробки фородезином, причому спочатку це була p37-розщеплена форма прокаспази-9, з наступним збільшенням p43/41-розщепленої форми каспази-8. Розщеплення прокаспази-3 та присутність її активної форми було виявлено пізніше. У зв'язку з активацією каспази-8 фородезин також викликав зниження лише BH3-білка BID, головного субстрату каспази-8, для одержання його зрізаної проапоптичної форми, яка також активує мітохондріальний апоптичний шлях. Також спостерігалось зниження інгібіторів апоптозу XIAP та сурвівіну і протеолітичне розщеплення PARP, субстрату каспази-3 у зв'язку з викликанням апоптозу. Крім того, досліджували роль активації каспази у викликаному фородезином апоптозі, оскільки активація мітохондріального апоптичного шляху веде до залежного, а також незалежного від каспази відмирання клітин. Обробка клітин інгібітором каспаз широкої дії z-VAD.fmk частково знижує дію на фосфатидилсерин після обробки Фородезином протягом 24 годин, що свідчить про участь залежних, а також незалежних від каспази механізмів дії.

Активація каспази-8/BID може відігравати ключову роль під час викликання апоптозу, що забезпечується фородезином, або може бути вторинним побічним явищем через активацію каспази-9, а отже, після мітохондрій. Цікавим є те, що викликання апоптозу, яке аналізують шляхом забарвлення AnnexinV, частково блокувалося специфічним інгібітором каспази-8 z-EETD.fmk, тоді, як усунення втрати ΔΨ_m, яке спостерігалось, було більш вираженим. Разом ці результати свідчать про те, що активація каспази-8 та BID відіграють ранню посилювальну роль під час мітохондріального апоптичного шляху, викликаного фородезином.

Аналіз проапоптичних та антиапоптичних регуляторів опосередкованого мітохондріями відмирання клітин.

Мітохондріальний апоптичний шлях регулюється через точний баланс між про- та антиапоптичними зразками, які належать до BCL-2-родини білків, до яких, крім інших, належать антиапоптичні білки BCL-2 та MCL-1 і проапоптичні білки BAX, BAK, BID та BIM. Клітини CLL мають високий рівень експресії антиапоптичних білків MCL-1 та BCL-2, який обернено корелюється з *in vitro* та клінічною реакцією на хіміотерапію. Досліджували вплив інкубації з Фородезином на рівень цих антиапоптичних білків. Після обробки фородезином рівень антиапоптичного білка MCL-1 значно знижувався, тоді, як рівень білка BCL-2 залишався незмінним. Лише BH3 білок BIM взаємодіє з BCL-2 та іншими антиапоптичними представниками родини BCL-2 для викликання апоптозу. Фородезин викликав підвищення рівня проапоптичних білків BIM. Зміни рівня білків BIM та MCL-1 підтверджувалися денситометричним аналізом у семи випадках CLL, які лікували фородезином. Спостерігалася пряма кореляція між підвищенням рівня проапоптичного білка BIM EL або зниженням рівня MCL-1 та цитотоксичною реакцією на фородезин, що свідчить про зниження MCL-1 (p=0,04). Крім того, було виявлено значну кореляцію (p=0,04) при побудові графіка залежності співвідношення (відносно контролю) між зниженням індукції MCL-1 та BIM EL від цитотоксичності, яка спостерігалася після обробки фородезином.

BCL-2 та MCL-1 діють як захисники мітохондріальної мембрани, зберігаючи її цілісність від дії ефекторних проапоптичних білків, таких, як BAX та BAK. BIM та зрізаний BID є лише BH3 білками, здатними діяти як прямі активатори BAX та BAK, і активацію BAX та BAK шляхом проточної цитометрії після інкубації клітин CLL з фородезином піддавали аналізу. Фородезин викликав конформаційні зміни BAX та BAK, які дозволяють вставляти ці білки у зовнішню мітохондріальну мембрану, олігомеризацію, наступне викликання проникності мітохондріальної мембрани та активацію механізму відмирання клітин.

Обробка Фородезином започатковує підвищення p73 в мРНК та рівень білка та індукцію FOXO1 та FOXO3A.

Хоча фородезин забезпечував цитотоксичний ефект в у всіх випадках CLL, незалежно від стану p53, фородезин був здатен викликати стабілізацію білка p53 у випадках CLL без делеції 17p. Індукція білка TAp73, спорідненого з p53 білка, що вимагається для опосередкованого p53 апоптозу, здатна долати резистентність до апоптозу клітин CLL без функціонального p53 (Dicker et al, Blood, 108 (10), 3450-3457 (2006)). Обробка Фородезином викликає явну підвищувальну

регуляцію рівня мРНК p73 та білка TAp73 в усіх проаналізованих випадках CLL. P73 регулює індукцію проапоптичного білка BIM через підвищувальну регуляцію факторів транскрипції FOXO1 та FOXO3a у p53-залежн, а також p53-незалежний спосіб у пухлинних клітинах (Amin et al, Cancer Res, 67 (12), 5617-5621 (2007)), хоча механізм індукції FOXO є невідомим.

5 Досліджували рівень FOXO1 та FOXO3a у клітинах CLL, оброблених фородезином. Фородезин викликав підвищення як FOXO1, так і FOXO3a, у зв'язку з підвищенням рівня білків p73 та BIM, яке спостерігалось.

Матеріали та способи

Медикаменти та хімічні сполуки

10 Фородезин (BCX-1777/імуцилін Н) для лабораторного застосування було отримано від BioCryst Pharmaceuticals Inc. (Birmingham, США), а дезоксигуанозин (dGuo) було придбано у Sigma. Для кількісного визначення дезоксигуанозин трифосфату (dGTP), dNTP та [³H]dATP отримували від Amersham Biosciences. Флударабін (Shering, Берлін, Німеччина), бендамустин гідрохлорид (Treanda™, від Cephalon, Inc., Frazer, PA), ритуксимаб (Roche, Basel, Швейцарія) та 2'-дезокситидин (Sigma) застосовували для аналізів цитотоксичності.

15 Виділення та культивування первинних клітин CLL та моноклеарних клітин периферичної крові здорових донорів

Представлене *in vitro* дослідження здійснювали у первинних лейкозних лімфоцитах 43 пацієнтів, у яких було діагностовано CLL згідно з класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я. Кожен пацієнт дав згоду на основі отриманої інформації.

20 Моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяли шляхом осадження у Ficoll/Нураке (Seromed, Берлін, Німеччина). Клітини використовували безпосередньо або піддавали кріоконсервації у рідкому азоті у присутності 10 % диметилсульфоксиду та 90 % інактивованої нагріванням ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS, Gibco Paisley, Шотландія, Великобританія). Після розморожування моноклеарні клітини пацієнтів з CLL (2×10^6 клітин/мл) культивували у культуральному середовищі RPMI 1640 (Gibco), доповненому 10 % FBS, 2 мМ глутаміну та 50 мкг/мл пеніциліну-стрептоміцину, у зволоженій атмосфері при 37 °C, яка містила 5 % діоксиду вуглецю. Відсоток рівня експресії пухлинних клітин (CD19⁺, CD5⁺), ZAP-70 та CD38 піддавали аналізу шляхом проточної цитометрії і визначали кількість, як описано вище (Crespo et al., N Engl J Med, 348(18), 1764-1775 (2003)). Порогова точка для високого рівня експресії ZAP-70 становила > 20 % і > 30 % для CD38 (Hus et al, Ann Oncol, 17 (4), 683-690 (2006)). Усі зразки CLL, які використовували у цьому дослідженні, містили понад 95 % пухлинних клітин. Цитогенні зміни оцінювали шляхом флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) з застосуванням багатопробного комерційного комплексу від Vysis (Downers Grove, IL), який містить локус-специфічні проби для визначення делецій 17p13.1 (p53), 11q22.3 (ATM) та 13q14.3 (D13S319) та центромерну пробу для виявлення трисомії 12. Мутації гена p53 зазвичай є місенс-мутаціями, і мутантний білок має подовжений півперіод, що дозволяє виявити його шляхом вестерн-блотингу. Крім того, мутації p53 підтверджувалися шляхом прямого секвенування згідно з консорціумом IARC TP53.

40 Викликання апоптозу

Клітини інкубували у різні моменти часу з фородезином у дозі від 1 до 12 мкМ у присутності або за відсутності 10-20-30 мкМ дезоксигуанозину (dGuo). Якщо показано, клітини попередньо інкубували протягом 1 години з інгібітором пан-каспази z-VAD.fmk (бензилоксикарбоніл-Val-Ala-Asp-фторометилкетон; Bachem, Bubendorf, Швейцарія) при 80 мкМ, інгібітором каспази-8 z-IETD.fmk при 50 мкМ (Z-Ile-Glu(OMe)Thr-DL-Asp (OMe)-фторометилкетон, Bachem), 2'-дезокситидином (5-10-20 мкМ, Sigma), N-ацетил-L-цистеїном (NAC, 25 мМ), Tiron (5 мМ, 4,5-Дигідрокси-1,3-Бензол-дисульфонова кислота, Sigma) або GSH (2 мМ; Sigma). Для досліджень комбінацій медикаментів, клітини попередньо обробляли протягом 4, 12 або 24 годин флударабіном або бендамустином або протягом 1 години моноклональним антитілом проти CD20 ритуксимабом перед додаванням фородезину (2 мкМ) плюс dGuo (10-20 мкМ). Життєздатність клітин та викликання апоптозу аналізували за змінами у складності клітин шляхом визначення кількості за допомогою FSC/SSC, кількісного визначення дії на фосфатидилсерин (PS) шляхом подвійного забарвлення Annexin-V, кон'югованим з флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) та пропідіум йодидом (PI) (BenderMedSystems, Відень, Австрія). Для аналізу апоптозу у популяціях CD3⁺ та CD19⁺PBMC мітили одночасно з антитілом проти CD3-FITC (Immunotech, Марсель, Франція), проти CD 19-PE (Becton Dickinson) та Annexin-V-APC. Будували графік залежності життєздатності клітин та цитотоксичності як відсоток відносно контрольних клітин. Втрату мітохондріального трансмембранного потенціалу ($\Delta\psi_m$) визначали шляхом забарвлення клітин 20 нМ DiOC₆ (3,3-дітилоксакарбоціанін йодид, Molecular Probes) і вироблення активних форм кисню (ROS) визначали шляхом забарвлення клітин 2 мкМ

дигідроетидину (DHE; Molecular Probes) та аналізу проточної цитометрії. Активацію проапоптичних білків Bax та Bak через конформаційну зміну аналізували шляхом імуноцитометричного мічення клітин антитілами, спрямованими проти NH₂-кінцевих білків Bax або Bak, як описано вище (Bellosillo et al. Blood, 100 (5), 1810-1816 (2002)). Ця ділянка є закритою у базальних станах і є недоступною для зв'язування NH₂-кінцевими епітоп-специфічними антитілами. Після апоптичних подразників конформаційна зміна цих білків відкриває NH₂-кінець та гідрофобний COOH-кінець, спрямований на мітохондрії, що відіграє важливу роль у викликанні механізму відмирання клітин, опосередкованого мітохондріями. Стисло кажучи, клітини один раз промивали у PBS і фіксували у 4 % параформальдегіді, пермеабілізували 0,1 % сапоніном та 0,5 % альбуміном сироватки великої рогатої худоби (BSA). Клітини забарвлювали 1 мкг/мл первинних антитіл проти конформаційних активних антитіл Bak (Oncogene Research) або Bax (clone 6A7, BD Pharmingen) при кімнатній температурі. Після кількох промивань у пермеабілізаційному буфері клітини інкубували з вторинним антитілом кози проти миші FITC (DAKO) або кози проти кроля FITC (Supertechs) і знову промивали пермеабілізаційним буфером. Після цього десять тисяч забарвлених клітин на зразок аналізували шляхом проточної цитометрії.

Вимірювання внутрішньоклітинного рівня dGTP

15×10^6 первинних клітин CLL інкубували з застосуванням або без застосування флорозину (2 мкМ) та dGuo (10 мкМ) або флударабіну (1 нг/мл) протягом 18 годин і нуклеотиди екстрагували з 60 % метанолу і внутрішньоклітинний рівень dGTP кількісно визначали шляхом аналізу з застосуванням ДНК полімерази, модифікованого Шерменом та Файфом (Sherman et al, Anal Biochem, 180 (2), 222-226 (1989)). Дані виражали як кратну індукцію внутрішньоклітинного рівня dGTP відносно контрольних клітин. Паралельно також визначали життєздатність клітин через 24 та 48 годин.

Імуноблотинг

Клітини піддавали лізису протягом 15 хв у буфері RIPA, доповненому інгібіторами протеази та фосфатази (10 мкг/мл лейпептину, 10 мкг/мл апопротиніну, 1 мкМ PMSF, 1 мкМ ортованадату натрію, 1 мкМ NaF, 2 мкМ пірофосфату декагідрату натрію (Sigma). Загальну кількість клітинних білків відокремлювати за допомогою SDS-PAGE у відновних умовах і переносили на мембрани Immobilon-P (Millipore). Для виявлення білка мембрани випробували такими первинними антитілами: проти Bim, проти Bak (Ab1) проти каспази-8 (Ab-3), проти p53 (Ab-2) (Calbiochem); проти Bid, проти каспази-9, проти FoxO1 та проти XIAP (Cell Signaling Technologies); проти Bcl-2, проти dCK, проти Mcl-1 (S-19) та проти p73 (клон 5B429) (Santa Cruz Biotechnology); проти PARP (Roche); проти каспази-3 та проти Bax (клон 6A7) (BD-Pharmingen); проти сурвівіну (Abeam); проти β -актину та проти α -тубуліну (Sigma) і проти FoxO3A (Upstate). Антитіло кроля проти фосфо-dCK (Ser79) та кроля проти dCK було люб'язно надано Caroline Smal and Françoise Bontemps (Universite Catholique de Louvain, Бельгія). Після інкубації з відповідним первинним антитілом, блоти проявляли міченими пероксидазою хрому (HRP) антитілами проти миші (Sigma), проти кроля (Sigma) або проти кози (Dako), застосовуючи реагенти з посиленою хемолюмінесцентною міткою (ECL) (Pierce). Однакове білкове навантаження підтверджувалося експресією β -актину або α -тубуліну, і відносну кількість білка визначали за допомогою програми Image Gauge Fujifilm software (Fuji).

Кількісне визначення мРНК шляхом RT-PCR у реальному часі

Загальну РНК екстрагували з 10^7 клітин, застосовуючи реагент TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) згідно з вказівками виробника. Один мікрограм загальної РНК після цього ретротранскрибували до кДНК, застосовуючи випадкові праймери та зворотну транскриптазу M-MLV (Invitrogen). Рівень експресії p73 та Mcl-1 визначали за допомогою системи ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), використовуючи попередньо розроблений Assay-on-demand (Applied Biosystems). Відносну експресію кожного гена кількісно визначали способом порівняльного порогового циклу (Ct) ($\Delta\Delta C_t$), застосовуючи GUS як ендogenous контроль. Рівень експресії мРНК брали як довільні кількісні одиниці PCR, беручи за еталон контрольний зразок (необроблений) кожного випадку.

Статистичний аналіз

Дані представлено як середні значення \pm стандартне відхилення (SD) трьох незалежних експериментів. Статистичний аналіз повністю здійснювали з застосуванням програми Graphpad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Порівняння між двома групами зразків оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Вітні і коефіцієнти кореляції визначали за допомогою тесту Спірмана. Результати вважали статистично значущими при р-значенні $\leq 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$). Для оцінки комбінованого ефекту між двома різними медикаментами аналізували комбінаційний індекс або значення CI, застосовуючи

алгоритм, описаний Chou and Talalay (Calculusyn software v2.0, Biosoft, Кембридж, Великобританія) (Chou et al., Adv Enzyme Regul, 22, 27-55 (1984)). Це значення CI є відмінною ознакою антагоністичного або синергетичного ефекту для комбінованого ефекту двох різних медикаментів. Взаємодія між двома медикаментами вважалася синергетичною, якщо значення CI було нижчим за 1, адитивною, якщо дорівнювало 1, і антагоністичною, якщо значення CI було вищим за 1.

Було описано кілька варіантів втілення винаходу. Незважаючи на це, слід розуміти, що існує можливість різних модифікацій без відхилення від суті та обсягу винаходу. Відповідно, інші варіанти охоплюються обсягом представленої нижче формули винаходу. Усі наведені авторами публікації, патенти та патентні заявки є включеними шляхом посилання.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування раку кровотворної системи у суб'єкта, який включає етапи:
 - (a) введення суб'єктові ефективної кількості Фородезину; та
 - (b) введення суб'єктові ефективної кількості Бендамустину.
2. Спосіб за п. 1, у якому Фородезин та Бендамустин вводять одночасно.
3. Спосіб за п. 1, у якому Фородезин та Бендамустин вводять послідовно.
4. Спосіб за п. 3, у якому Бендамустин вводять один або кілька разів перед введенням Фородезину.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, у якому рак кровотворної системи є резистентним до аналога пуриннуклеозиду.
6. Спосіб за п. 5, у якому аналог пуриннуклеозиду являє собою Флударабін.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, у якому рак кровотворної системи являє собою неходжкінську лімфому.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, у якому рак кровотворної системи являє собою хронічний лімфоцитарний лейкоз.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, у якому рак кровотворної системи являє собою гострий лімфобластний лейкоз.
10. Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично ефективні кількості Фородезину та Бендамустину та принаймні один фармацевтично прийнятний наповнювач.
11. Комплект, який містить Фородезин та Бендамустин.
12. Комплект за п. 11, який додатково містить систему доставки для Фородезину, Бендамустину або їх комбінації.
13. Комплект за п. 11 або п. 12, який додатково містить інструкції з лікування суб'єкта.

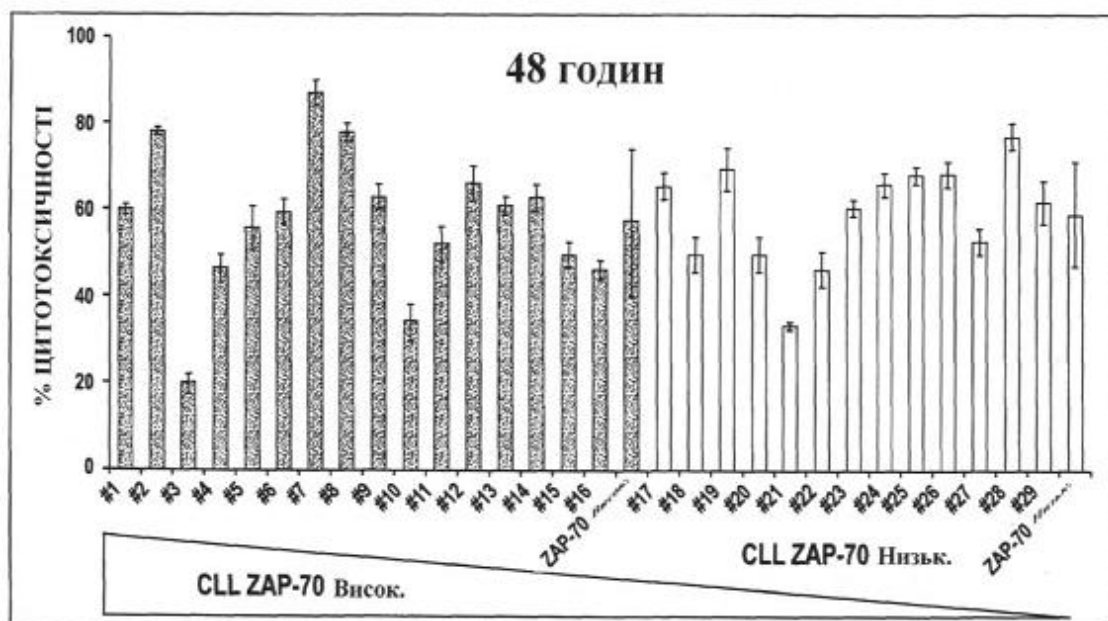


Fig. 1A



<u>Середня цитотоксичність:</u>
CLL ZAP-70 висок. = 57,59%
CLL ZAP-70 низьк. = 59,27%

Fig. 1B

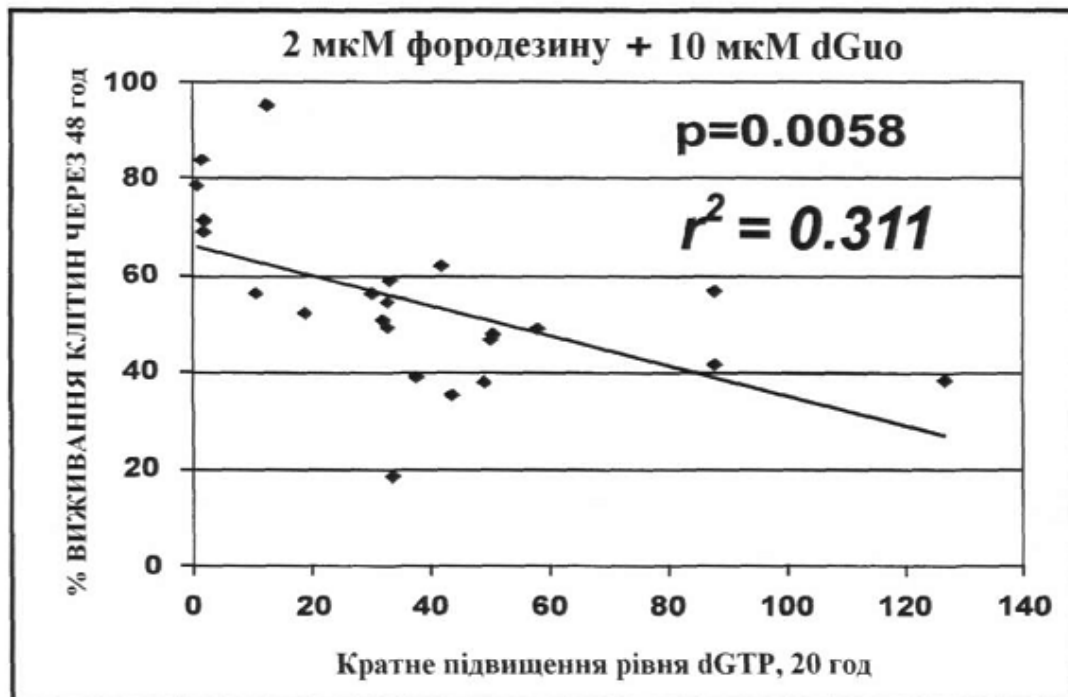


Fig. 2

CLL % ZAP – 70	СТАН АТМ	12 тижнів (%) клітин	13 тижнів (%) клітин	ПОПЕРЕДНІС ЛІКУВАННЯ	РЕАКЦІЯ НА ПОПЕРЕДНІС ЛІКУВАННЯ	ЦИТОТОКСИЧ- НІСТЬ ФОРДЕЗИНУ (2мкМ+ dGao 20 мкМ)	(ЦИТОТОКСИЧ-НІСТЬ БЕНДАМУСТИНУ (25 мкМ)	ЦИТОТОКСИЧ-НІСТЬ ФЛУДАРАБІНУ 1 мкМ/мЛ(7.5 мкМ)		
#7 60%	Нормальний	Нормальний	11.4 %	CdA/FCM	ТАК	87.2 ±3%	12.5 ±4%	2.1 ±2%		
#28 1%	Нормальний	Нормальний	Нормальний	FCR/R-CHOP	НІ	77.1 ±5%	41.8 ±2%	43.3 ±3%		
#8 53%	Нормальний	Нормальний	90%	-	-	77.9 ±2%	40.6 ±2%	31.1 ±2%		
#2 91%	Нормальний	45%	Нормальний	FCM	ТАК	78.2 ±2%	63.2 ±3%	59.2 ±4%		
#25 3%	Нормальний	Нормальний	5%	CLB	НІ	68.3 ±4%	23.9 ±3%	25.9 ±3%		
#9 50%	Нормальний	Нормальний	Нормальний	R-CHOP	НІ	63.1 ±4%	не визн.	не визн.		
#12 16%	Нормальний	Нормальний	29%	-	-	66.1 ±3%	26.47 ±3%	42.63 ±2%		
#4 73%	не визн.	не визн.	не визн.	FCM / CHOP	НІ	46.7 ±4%	52.7 ±4%	50.1 ±4%		
#22 не визн.	Нормальний	Нормальний	Нормальний	-	-	46.5 ±2%	5.8 ±3%	1.1 ±2%		
#21 7%	Нормальний	30.5 %	Нормальний	CHOP/R-CHOP	НІ	33.4 ±3% * *	38.3 ±3%	40.1 ±2%		
#3 87%	Нормальний	Нормальний	90%	FCM Camp/PDN	НІ	20.1 ±3% **	19.2 ±2%	27.3 ±3%		
						CLL#/DEL	±SD	60.4 ±21%	32.8 ±34%	33.3 ±36%

Fig. 3

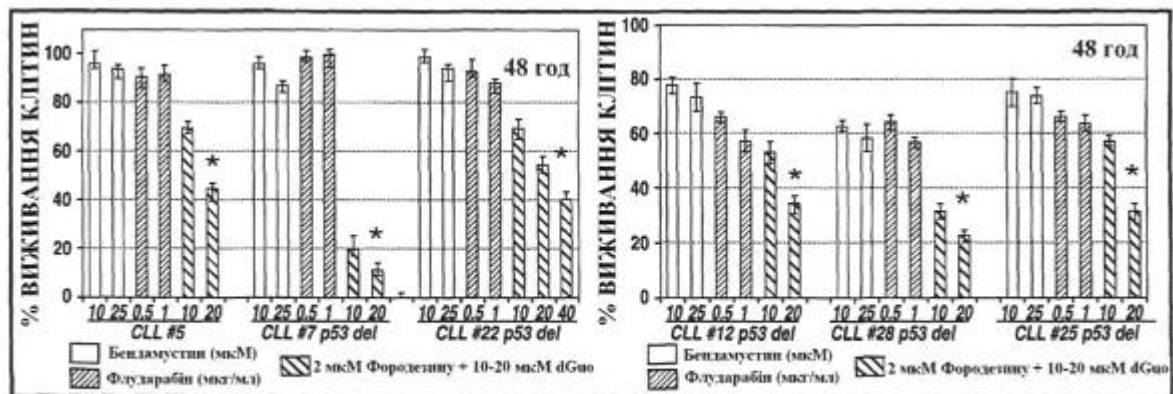
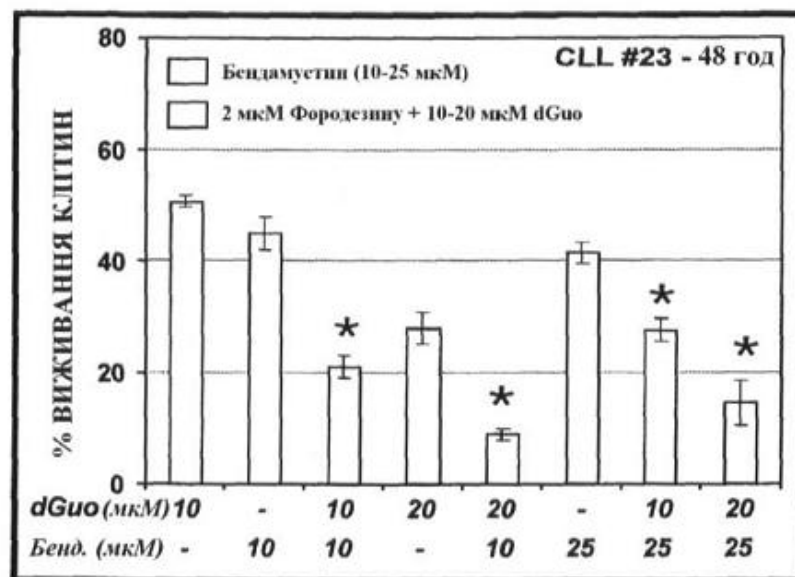


Fig. 4

Комбінаційний індекс для Форозезину/Бендамусти́ну (48 год)									
CLL	Фор. 2+10	Фор. 2+10	Фор. 2+20	Фор. 2+20	CLL	Фор. 2+10	Фор. 2+10	Фор. 2+20	Фор. 2+20
% ZAP-70	Бенд. 10	Бенд. 25	Бенд. 10	Бенд. 25	% ZAP-70	Бенд. 10	Бенд. 25	Бенд. 10	Бенд. 25
#24 2%	0,70	1,05	0,52	0,44	#6 30%	1,11	0,36	0,73	0,46
#19 12%	0,53	0,83	0,36	0,61	#100 100%	0,77	0,82	0,90	0,80
#23 0,4%	0,94	0,52	0,40	0,50	#74 64%	0,70	0,79	0,76	0,55
#20 19%	0,54	0,64	0,81	0,82	#42 72%	0,93	0,73	0,71	0,75
#27 3%	0,56	0,57	0,45	0,46	#18 29%	0,14	0,04	0,1	0,04
#21 4%	0,26	0,50	0,10	0,24	#17 41%	1,02	1,10	0,98	1,10
#12 10%	0,65	0,28	0,59	0,34	#10 30%	0,51	0,49	0,27	0,20
#15 25%	0,63	0,59	0,25	0,19	#36 42%	0,35	0,51	0,29	0,26
#50 1%	0,31	0,27	0,46	0,43	#16 32%	0,85	0,83	0,30	0,27
ZAP-70 ^{Low}	0,51	0,52	0,39	0,40	ZAP-70 ^{High}	0,63	0,56	0,50	0,44
Середн. CI					Середн. CI				

Fig. 5A



Комбінація Флударабіну/Флорезину (мкМ)						
Середн. CI = 1.96 (CI > 1 свідчить про антагоністичний ефект)						
Комбінаційний індекс 6 типових випадків CLL (48 год):						
CLL	#5	#23	#13	#11	#12	#27
1. Флорд. 2 + dGuo10 + Флудар. 3,75 →	1,62	3,09	1,56	1,31	2,31	1,78
2. Флорд. 2 + dGuo10 + Флудар. 7,5 →	1,81	3,41	1,13	1,52	1,92	2,14
3. Флорд. 2 + dGuo20 + Флудар. 3,75 →	1,29	1,37	1,31	1,45	1,96	1,51
4. Флорд. 2 + dGuo20 + Флудар. 7,5 →	1,23	2,62	1,60	1,42	1,76	1,59

Fig. 5B

Комбінаційний індекс (CI) < 1 свідчить про синергізм (спосіб Chou & Talalay).								
Проаналізовані комбінації:	CLL	#3	#74	#1	#87	#42	#6	#92
Ритуксимаб 25 + Фород. 2 + dGuo10:	0,64		0,73	0,59	0,13	0,88	0,46	0,72
Ритуксимаб 50 + Фород. 2 + dGuo10:	0,56		0,72	0,76	0,13	0,52	0,74	0,77
Ритуксимаб 25 + Фород. 2 + dGuo20:	0,51		0,55	0,49	0,12	0,63	0,35	0,60
Ритуксимаб 50 + Фород. 2 + dGuo20:								
<u>Комбінаційний індекс</u>			Середн. CI = 0,53					

Fig. 6