



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2008136191/15, 09.02.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.02.2007(30) Конвенционный приоритет:
09.02.2006 US 60/771,678(43) Дата публикации заявки: **20.03.2010**(45) Опубликовано: **20.08.2010** Бюл. № 23(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 03/037314 A2, 08.05.2003. ДЫМНЕТ О.Н. Гликоли и другие производные окисей этилена и пропилена. 26.10.1978, найдено в Интернете: http://www.propylenglicol.ru/Nauka_o_propilenglikole_Dopolnitelno_53.htm.**(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **09.09.2008**(86) Заявка РСТ:
US 2007/061951 (09.02.2007)(87) Публикация РСТ:
WO 2007/092964 (16.08.2007)Адрес для переписки:
**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364**

(72) Автор(ы):

**ЛЕНАЗ Луиджи (US),
РЕДДИ Гуру (US),
МИРЕЖОВСКИ Дорла (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**СПЕКТРУМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)****(54) ЛЕЧЕНИЕ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ EO9 И ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к фармацевтическому средству для лечения рака мочевого пузыря, включающему в себя EO9 в растворе с концентрацией

пропиленгликоля (ПГ), выбранному из группы, состоящей из приблизительно 30% объем/объем ПГ, приблизительно 20% объем/объем ПГ и приблизительно 10% объем/объем ПГ. 2 н. и 22 з.п. ф-лы, 1 табл., 13 ил.

RU 2 3 9 6 9 5 3 C 2

RU 2 3 9 6 9 5 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008136191/15, 09.02.2007**

(24) Effective date for property rights:
09.02.2007

(30) Priority:
09.02.2006 US 60/771,678

(43) Application published: **20.03.2010**

(45) Date of publication: **20.08.2010 Bull. 23**

(85) Commencement of national phase: **09.09.2008**

(86) PCT application:
US 2007/061951 (09.02.2007)

(87) PCT publication:
WO 2007/092964 (16.08.2007)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

**LENAZ Luidzhi (US),
REDDI Guru (US),
MIREZhOVSKI Dorla (US)**

(73) Proprietor(s):

SPEKTRUM FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US)

(54) E09 AND PROPYLENE GLYCOL THERAPY OF URINARY BLADDER CANCER

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, particularly to a pharmaceutical agent for urinary bladder cancer treatment containing EO9 in the solution with propylene glycol (PG) concentration chosen from the group consisting of approximately

30% volume/volume of PG, approximately 20% volume/volume of PG and approximately 10% volume/volume of PG.

EFFECT: there is offered method of treating of urinary bladder cancer.

24 cl, 1 tbl, 2 ex, 9 dwg

RU 2 396 953 C2

RU 2 396 953 C2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННУЮ ЗАЯВКУ

По данной заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США №60/771678, поданной 9 февраля 2006 года.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Настоящее изобретение относится к лечению рака мочевого пузыря посредством способов и композиций ЕО9. В настоящем изобретении возможно использование концентраций пропиленгликоля и/или NAD(P)H: экспрессии хинон оксидоредуктазы-1 (NQO1), оксидоредуктазы цитохрома P450 (P450R) и белка-транспортера глюкозы 1
10 (Glut-1) в переходно-клеточной карциноме мочевого пузыря человека с целью предложения индивидуального направленного лечения рака мочевого пузыря.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Рак мочевого пузыря является одним из семи наиболее часто встречающихся опухолей в мире. В 2000 году он занимал четвертое место по распространенности у мужчин в Соединенном Королевстве при 9000 новых случаев, которые были диагностированы в том году (1). В 2002 году в Европе было выявлено 280000 случаев рака мочевого пузыря и более чем 60000 новых случаев предполагали в Соединенных Штатах в 2004 году.

20 Наиболее распространенным морфологическим типом рака мочевого пузыря (приблизительно 90%) является переходно-клеточная карцинома (ТСС), которая происходит из уротелия, клеток, выстилающих внутреннюю поверхность мочевыводящей системы (мочеточников, мочевого пузыря и уретры). Переходно-клеточную карциному (ТСС) можно классифицировать как поверхностную (pTa и pT1) или инвазивную в мышечный слой (>pT2). Лечение поверхностного ТСС в
25 настоящее время является трансуретральная резекция (ТУР; т.е. хирургическое удаление всех видимых изменений), за которым следует адъювантная химиотерапия или иммунотерапия. Достоверное снижение количества рецидивов для
30 поверхностных опухолей, наблюдаемое после адъювантной химиотерапии, при сравнении с одним только ТУР доказывает обоснованность такого лечения (2). В то время как в повседневной практике применяют средства, такие как Митомицин С (ММС), Эпирубицин и VCG, широко известно, что существует необходимость
35 разрабатывать более эффективные и/или менее токсичные средства против ТСС или применять современные терапевтические средства более правильно в плане таргетного лечения индивидуумов (или подгрупп пациентов), что является скорее всего более выгодным.

40 Митомицин С (ММС) является противоопухолевой композицией на основе встречающегося в природе хинона, который принадлежит к классу соединений, известных как биоредуктивные лекарственные средства (3). В основном биоредуктивные лекарственные средства являются предшественниками
45 лекарственных средств, для которых необходима метаболическая активация для получения цитотоксических метаболитов, и все они предназначены для устранения клеток в состоянии гипоксии, которые расположены в недостаточно кровоснабжаемых районах солидных опухолей. Однако данные лекарственные средства также могут быть направлены на аэробные участки опухоли.

50 Ключевыми параметрами, которые определяют цитотоксичную избирательность биоредуктивных лекарственных средств на основе хинона (т.е. между гипоксическими и аэробными опухолевыми клетками), являются наличие специфичных ферментативных редуказ, необходимых для восстановления предшественника лекарственного средства, и способность молекулярного

кислорода менять процесс активации (4, 5) (хотя относительная роль редуктаз и давления кислорода в прекращении клеточной гибели зависит от рассматриваемого соединения (4, 6)). Факт, что ММС регулярно применяют при лечении ТСС, предполагает, что для данного заболевания характерно наличие не только соответствующей биохимической машины, необходимой для биоредуктивной активации, но и, что другие соединения данного класса также могут быть использованы для лечения данного заболевания. Два примера дополнительных соединений, которые могут быть использованы, включают в себя производное индолхинона EO9 и азиридирил бензохинон RH1 (7, 8).

Как указано, способность лекарственных средств на основе хинона устранять аэробные или гипоксические клетки в значительной степени определяют по комплексному взаимоотношению между энзимологией опухолей, включающей наличие редуктаз, и гипоксией. В активацию биоредуктивных лекарственных веществ вовлечено несколько редуктаз (4, 6), хотя существенное внимание отдано ферментам редуктазы цитохрома P450 (P450R) и NAD(P)H:хинон оксидоредуктазе-1 (NQO1). Принимая во внимание измерение гипоксии, показано, что эндогенные маркеры, такие как транспортер глюкозы-1 (Glut-1) или карбоангидраза IX (CAIX), коррелируют с экзогенными гипоксийными маркерами, такими как пимонидазол (9, 10). Таким образом, взаимоотношение между опухолевой гипоксией и экспрессией двух ведущих редуктаз при поверхностной и инвазивной переходо-клеточных карциномах (ТСС) мочевого пузыря является ключевым определяющим моментом. Кроме того, для лечения рака мочевого пузыря необходимо использование фармацевтических композиций с различными степенями проникновения для целевого действия на поверхностные опухоли или опухоли, инвазивные в мышечный слой. Настоящее изобретение относится к данным аспектам лечения рака мочевого пузыря.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Достоверные отличия в экспрессии NQO1 были обнаружены между поверхностными и инвазивными опухолями с наблюдаемыми низкими уровнями в опухолях с инвазией в мышечный слой. Напротив, P450R и Glut-1 экспрессировались на всех стадиях и степенях дифференцировки ТСС, хотя экспрессия возрастала с опухолевой стадией (в частности, в случае Glut-1). Кроме того, экспрессия Glut-1 была достоверно повышена в опухолях стадии G3, принимая во внимание существующие низкие уровни NQO1. Данные результаты демонстрируют очевидные отличия в экспрессии NQO1 и Glut-1, существующие между поверхностным и ТСС мочевого пузыря. Кроме того, обнаружены фармацевтические композиции биоредуктивных лекарственных веществ на основе хинона с различными уровнями проникновения.

Данные результаты, имеющие терапевтическое применение биоредуктивных лекарственных веществ на основе хинона в данной монокомпозиционной терапии, могли бы подойти для поверхностного заболевания, тогда как для заболевания с инвазией в мышечный слой предпочтительным было бы комбинированное лечение с применением хинонов для направленного действия на гипоксическую фракцию и других терапевтических способов лечения для эрадикации аэробной фракции. Кроме того, фармацевтические композиции с низкими уровнями проникновения можно выбирать при лечении поверхностных опухолей мочевого пузыря, в то время как фармацевтические композиции с высокими уровнями проникновения можно выбирать при лечении опухолей мочевого пузыря с инвазией в мышечный слой.

Объединяя вышесказанное, данные аспекты настоящего изобретения обеспечивают важный прогресс в лечении рака мочевого пузыря посредством предоставления адаптаций к конкретным характеристикам профиля заболевания индивидуума для лечения опухоли.

5 В частности, один из вариантов осуществления согласно настоящему изобретению относится к способу лечения рака мочевого пузыря, включающего в себя определение уровней, по меньшей мере, одного белка внутри опухоли и выбора
лечения на основании, по меньшей мере, одного уровня белка, где лечение включает
10 в себя введение биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона как одного, так и в сочетании с другим лечением.

В другом варианте осуществления белок выбран из группы, состоящей из NAD(P)H: хинон оксидоредуктазы-1 (NQO1) и NADPH редуктазы цитохрома P450 (P450R). В конкретном варианте осуществления белок является NQO1 и лечение
15 включает в себя введение только биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона. В другом конкретном варианте осуществления белок является NQO1 и лечение включает в себя введение биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона в сочетании с другим лечением. В другом варианте белок
20 является P450R и лечение включает в себя введение только биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона. В еще одном варианте белок является P450R и лечение включает в себя введение биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона в сочетании с другим лечением. В дополнительном
25 варианте осуществления настоящего изобретения белок является NQO1 и P450R и лечение включает в себя введение только биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона. В еще одном другом варианте осуществления NQO1 и P450R и лечение включает в себя введение только биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона в сочетании с другим лечением.

30 Один из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительно содержит определение степени гипоксии внутри опухоли и выбора лечения на основании, по меньшей мере, одного уровня белка и степени гипоксии. В конкретном варианте осуществления степень гипоксии определяют посредством измерения транспортера глюкозы 1 (Glut-1) и/или карбоновой ангидразы IX (CAIX).

35 Конкретный вариант осуществления соответственно настоящему изобретению относится к способу лечения рака мочевого пузыря, включающего в себя подбор лечения на основании уровней, выбранных из группы, состоящей из показателей NAD(P)H: хинон оксидоредуктазы-1 (NQO1), NADPH редуктазы
40 цитохрома P450 (P450R) и уровней транспортера глюкозы-1 (Glut-1), где лечение включает в себя введение биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона как одного, так и в сочетании с другим лечением. В различных аспектах данного конкретного варианта осуществления: показателем может быть NQO1 или P450R и лечение включает в себя введение только биоредуктивного
45 лекарственного вещества на основе хинона; показателем может быть NQO1 или P450R и лечение включает в себя введение биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона в сочетании с другим лечением; показателем может быть NQO1 или P450R и лечение включает в себя введение только биоредуктивного
50 лекарственного вещества на основе хинона; показателем может быть NQO1 или P450R и лечение включает в себя введение биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона в сочетании с другим лечением или показателем может быть NQO1, P450R и Glut-1 и лечение включает в себя введение только одного

биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона или в сочетании с другим лечением.

5 В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает в себя способ лечения инвазивного рака мочевого пузыря, включающий в себя определение
уровней NQO1 и Glut-1 внутри опухоли; подбора комбинированного лечения,
включающего биоредуктивное лекарственное вещество на основе хинона в
сочетании с другим лечением на основании того, что указанный уровень NQO1 ниже
и указанный уровень Glut-1 выше, что может наблюдаться, если указанная опухоль
10 является поверхностной.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя способ
разделения пациентов для адекватной терапии рака мочевого пузыря на основании
уровней экспрессии NQO1 и Glut-1 внутри указанной опухоли мочевого пузыря
пациента, включающий в себя: определение уровней экспрессии NQO1 и Glut-1 внутри
15 указанной опухоли мочевого пузыря пациента и введение биоредуктивного
лекарственного вещества как единственного терапевтического вещества, если
указанный пациент имеет поверхностный рак мочевого пузыря с высокими
уровнями NQO1, или проведение комбинированного лечения, где биоредуктивное
20 лекарственное вещество применяют в сочетании с лучевой терапией или другим
химиотерапевтическим средством, если указанный пациент имеет инвазивный рак
мочевого пузыря с низким уровнем NQO1 и высоким уровнем Glut-1.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения другим
лечением является лучевая терапия и/или введение, по меньшей мере, одного
25 химиотерапевтического средства.

В различных вариантах осуществления индивидуально применяемое
биоредуктивное лекарственное вещество на основе хинона может быть выбрано из
группы, состоящей из митомицина С, индолхинона ЕО9 и азиридинил
30 бензохинона (RH1) и их сочетания.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. В
частности, один из вариантов осуществления, соответствующий настоящему
изобретению, относится к фармацевтической композиции, включающей в себя ЕО9 в
растворе с пропиленгликолем (ПГ) в концентрации, выбранной из группы,
35 состоящей из приблизительно 30% объем/объем ПГ, приблизительно 20%
объем/объем ПГ и приблизительно 10% объем/объем ПГ. Концентрации ЕО9 могут
находиться в пределах от приблизительно 300 мкМ до приблизительно 400 мкМ. В
конкретном варианте осуществления композиция включает в себя раствор с
40 концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно могут
содержать NaHCO_3 , ЭДТА, маннит и воду. В одном из вариантов осуществления
композиция включает в себя от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 120
мг/мл NaHCO_3 . В конкретном варианте осуществления композиция включает в себя
45 приблизительно 100 мг/мл или приблизительно 100,25 мг/мл NaHCO_3 . В другом
конкретном варианте осуществления композиция включает в себя приблизительно 50
мг/мл NaHCO_3 или приблизительно 50,125 мг/мл NaHCO_3 . В другом варианте
осуществления композиция включает в себя от приблизительно 0,5 мг/мл до
50 приблизительно 3,0 мг/мл маннита. В конкретном варианте осуществления
композиция включает в себя приблизительно 0,625 мг/мл маннита. В другом
конкретном варианте осуществления композиция включает в себя 1,25 мг/мл
маннита. В другом конкретном варианте осуществления композиция включает в себя

приблизительно 100 мг/мл NaHCO_3 , приблизительно 0,625 мг/мл маннита и приблизительно 0,1 мг/мл ЕО9 в растворе, включающем в себя ЭДТА, ПГ и воду.

Один из вариантов осуществления в соответствии с настоящим изобретением относится к фармацевтической композиции, включающей в себя ЕО9, NaHCO_3 и маннит в растворе, включающем в себя ЭДТА, ПГ и воду, где ПГ находится в растворе в процентном соотношении, выбранном из группы, состоящей из от приблизительно 6% до приблизительно 14% объем/объем; от приблизительно 16% до приблизительно 24% объем/объем и от приблизительно 26% до приблизительно 34% объем/объем. В другом варианте осуществления ПГ находится в растворе в процентном соотношении, выбранном из группы, состоящей из приблизительно 10% объем/объем, приблизительно 20% объем/объем и приблизительно 30% объем/объем. В другом варианте осуществления композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ и с концентрацией ПГ приблизительно 10% объем/объем. В еще одном другом варианте осуществления композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ и с концентрацией ПГ приблизительно 20% объем/объем. В дополнительном варианте осуществления композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ и с концентрацией ПГ приблизительно 30% объем/объем. Данные описанные варианты осуществления настоящего изобретения могут включать в себя от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 120 мг/мл NaHCO_3 и в одном конкретном варианте осуществления будут включать в себя приблизительно 100, приблизительно 100,25 или приблизительно 50,125 мг/мл NaHCO_3 . Данные описанные варианты осуществления настоящего изобретения также могут включать в себя от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл маннита, и в одном конкретном варианте осуществления будут включать в себя приблизительно 0,625 или приблизительно 1,25 мг/мл маннита.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения может включать в себя фармацевтическую композицию, где композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ, с концентрацией ПГ приблизительно 10% объем/объем, NaHCO_3 приблизительно 100,25 мг/мл и маннита приблизительно 0,625 мг/мл. Другой вариант осуществления может включать в себя фармацевтическую композицию, где композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ, с концентрацией ПГ приблизительно 30% объем/объем, NaHCO_3 приблизительно 100,25 мг/мл и маннита приблизительно 0,625 мг/мл.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На фиг.1 представлен иммуногистохимический анализ NQO1, P450R и Glut-1 у трех пациентов с переходно-клеточной карциномой мочевого пузыря.

На фиг.2 представлен прибор, используемый для изучения проникновения лекарственного вещества через многослойный слой.

На фиг.3 представлено схематическое изображение получения раствора лекарственного вещества.

На фиг.4 представлена хроматограмма отрицательного образца, меченного WV14, в качестве внутреннего стандарта.

На фиг.5 представлены хроматограммы стандарта ЕО9 в культуре RPM1 1640.

На фиг.6 представлены хроматограммы стандарта ЕО9 в 0,1% DMSO (6A); 30% пропиленгликоле (ПГ; 6B); 20% ПГ (6C) и 10% ПГ (6D).

На фиг.7 представлены калибровочные кривые для EO9 в 0,1% DMSO и в различных концентрациях ПГ (30%; 20%; 10%).

На фиг.8 показано проникновение EO9 с различными концентрациями ПГ через многоклеточный слой DLD-1.

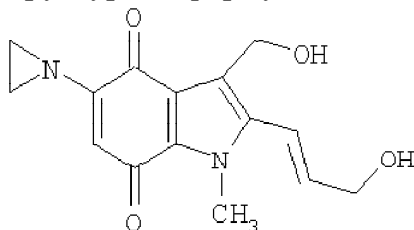
На фиг.9 представлены образцы поперечных сечений через окрашенные DLD-1 многоклеточные слои.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Биоредуктивные лекарственные вещества на основе хинона являются предшественниками лекарственных веществ, которые формируют цитотоксические производные после ферментной активации. Белок NAD(P)H:хинон оксиредуктаза-1 (NQO1; также называемый DT-диафороза (DTD)), двухэлектронный фермент редуктаза, играет заметную роль в активации биоредуктивных лекарственных веществ на основе хинона при аэробных состояниях. Биоредуктивные лекарственные вещества на основе хинона также являются цитотоксическими при гипоксических состояниях, включая клетки с низкой активностью NQO1. Белки, отщепляющие один электрон, такие как редуктаза цитохрома P450, могут играть более заметную роль в активации биоредуктивных лекарственных веществ на основе хинона при гипоксических состояниях. Исходя из вышеизложенного уровни данных редуктаз и состояния гипоксии могут показывать целесообразность различных схем лечения опухолей, включая целесообразность использования различных биоредуктивных лекарственных веществ на основе хинона. Настоящее изобретение таким образом оценивает уровни описанных редуктаз и степень гипоксического состояния при различных стадиях и степенях ТСС.

Прогресс в лечении рака мочевого пузыря также может наступить в результате обеспечения фармацевтическими препаратами, включающими в себя биоредуктивные лекарственные вещества на основе хинона с различными степенями проникновения. Например, фармацевтические препараты с низкими проникающими способностями могут быть полезны в применении при лечении поверхностных опухолей мочевого пузыря, т.к. лекарственное вещество может оставаться рядом с внутренней поверхностью мочевого пузыря, там где лечение наиболее необходимо. Напротив, фармацевтические композиции с высокими проникающими способностями могут быть полезны в применении при лечении опухолей мочевого пузыря с более выраженной инвазией в мышечный слой, т.к. лекарственное вещество может проникать в более глубокие слои мочевого пузыря, где в таких случаях наиболее необходимо лечение. Объединяя вышесказанное, данные аспекты настоящего изобретения обеспечивают важный прогресс в лечении рака мочевого пузыря посредством адаптации к конкретным характеристикам профиля заболевания индивидуума для лечения опухоли.

Апазиквон (prop.INN, USAN), также известный как EO9 или NSC-382459 (3-гидроксиметил-5-азиридилил-1-метил-2-(1H-индол-4,7-дион)пропенол со структурной формулой:



является полностью синтетическим биоредуктивным алкилирующим

индолохиноном. Считают, что основной механизм активации ЕО9 сходен с другими индолохинонами, включая восстановление посредством клеточных ферментов, которые отщепляют один или два электрона, с получением семихинона и гидрохинона соответственно. Окисление семихинона при аэробных условиях приводит к окислительно-восстановительному циклу, который может привести к клеточной гибели посредством образования активных форм кислорода (ROS), приводящих к разрывам цепей ДНК. В частности, при гипоксических условиях семихинон/гидрохинон может алкилировать и образовывать сшивки между ДНК и другими макромолекулами, вызывая клеточную гибель. ЕО9 является одним неограничивающим примером биоредуктивного лекарственного вещества на основе хинона, который пригоден для использования в настоящем изобретении.

Пример 1

I. Материалы и способы

A. Ткани человека

Фиксированные в формалине, залитые в парафин образцы переходно-клеточных карцином мочевого пузыря человека (n=52) применяли в исследовании после получения одобрения местного исследовательского и этического комитета (LREC) в соответствии с правилами Медицинского исследовательского совета. Для обеспечения конфиденциальности все сведения о пациенте были анонимны и все эксперименты выполняли в соответствии с руководством, изложенным в LREC. Опухоли, используемые в исследовании, представляли собой все степени дифференцировки (11 степень дифференцировки 1; 26 степень дифференцировки 2; 15 степень дифференцировки 3) как поверхностных (19 pTa; 19 pT1), так и инвазивных в мышечный слой (14 \geq pT2) стадий ТСС мочевого пузыря человека. Все опухолевые блоки применяли для изготовления тканевых микрочипов (ТМА) и последующего иммуногистохимического анализа.

B. Изготовление тканевых микрочипов

Композиции тканевых микрочипов (ТМА) изготавливали из залитых в парафин блоков для получения ТСС мочевого пузыря человека с различными степенями дифференцировки (G1-G3) и различными стадиями (pTa, pT1, \geq pT2). Композицию тканевого микрочипа (ТМА) получали посредством прибора для микрочипов Beecher Instruments (Silver Spring, MD, США) с применением модифицированного способа Vubendorf et al. (11), включенного в настоящий документ в качестве ссылки. В кратком изложении, секции каждого залитого в парафин донорского блока окрашивали с использованием гематоксилина и эозина (H&E), проверяли под микроскопом и маркировали область, содержащую интересующую ткань, на парафиновом блоке. Из данных выбранных областей посредством биопсии получали внутреннюю часть цилиндрической формы (600 мкМ) и переносили в принимающий блок. Тканевой сбор образцов включал четыре внутренних части из каждого опухолевого блока для обеспечения данных от каждого исходного блока. Суммарно 108 внутренних образцов, полученных от 26 пациентов, включили в блок ТМА и изготовили два ТМА блока. Срезы толщиной 5 мкМ нарезали из исходных ТМА блоков и разместили на предметных стеклах с применением ленточной системы переноса (Instrumedics, США). H&E окрашивание для гистологического подтверждения и цельности образцов выполняли на первом и каждом десятом секционном срезе от каждого микрочипового блока. ТМА композиции затем подвергали иммуногистохимическому анализу.

C. Антитела

Используемые антитела включали в себя мышинные моноклональные антитела против NQO1 (предоставленные докторами Siegel и Ross, Университет центра медицинских наук Колорадо, Денвер, США), козы поликлональные антитела, специфичные для P450R (Santa Cruz Biotechnology, США), мышинные моноклональные антитела против Ki67 (BD Biosciences, UK) и кроличьи поликлональные антитела, специфичные для транспортера глюкозы-1 (GLUT-1; Dako, UK).

D. Иммуногистохимия

Иммунолокализацию NQO1, P450R, GLUT-1 и Ki67 определяли с помощью иммуногистохимии, как было описано ранее (9, 10, 12, 13) и понятно обычным специалистам в данной области. В кратком изложении, после высвобождения антигена и блокирования связывания неспецифических иммуноглобулинов ТМА инкубировали с соответствующим первичным антителом: инкубировали в течение приблизительно 60 минут с анти-NQO1 антителом, разведенным в соотношении 1:1 TBSTM (10 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, 0,2% Tween 20, 5% нежирное сухое молоко); инкубировали в течение приблизительно 90 минут для P450R, разведенного в соотношении 1:100 в PBS; инкубировали в течение приблизительно 90 минут с анти-Glut-1 антителом, разведенным в соотношении 1:25 в PBS; или инкубировали всю ночь при 4°C с анти-Ki67 антителом, разведенным в соотношении 1:100 в PBS. Контроли выполняли с использованием нормального IgG вместо первичного антитела. Иммунолокализацию выполняли с использованием соответствующего биотинилированного вторичного антитела (разведенного 1:200; Vector Labs., США), за которой следовала амплификация с использованием набора Vectastain ABC (Vector Labs., США) и визуализация с 3,3'-диаминобензидином (DAB) (Vector Labs., США). Срезы затем контрастировали гематоксилином Харриса, дегидрировали, отмывали и помещали в среду для заключения DPX (Sigma, Великобритания).

E. Полуколичественный анализ иммуногистохимического окрашивания

Положительное иммунопрокрашивание подсчитывали полуколичественно с помощью трех независимых экспертов. Оба NQO1 и P450R были локализованы цитоплазматически внутри опухоли. Шкалу для эпителиального компонента каждого опухолевого внутреннего сектора, основанную на интенсивности и распределении окрашивания, устанавливали от 0 (нет окрашивания) до 4 (максимальная интенсивность окрашивания). Среднюю вычисленную интенсивность рассчитывали для каждого внутреннего сектора и каждой опухоли ТМА исходя из результатов независимых экспертов. Результаты сравнивали для выявления каких-либо взаимосвязей и корреляций с клинико-патологическими параметрами.

Степень положительного ответа Glut-1 в каждом внутреннем секторе ТМА анализировали и устанавливали бальную шкалу от 0 до 4, отображающую приблизительный процент опухолевых клеток, показывающих мембранное (0=нет окрашивания; 1=0-5% положительно; 2=5-15% положительно; 3=15-30% положительно; 4=>30% положительно). Среднюю вычисленную интенсивность рассчитывали для каждого внутреннего сектора и каждой опухоли ТМА исходя из результатов независимых экспертов. Результаты сравнивали для выявления каких-либо взаимосвязей и корреляций с клинико-патологическими параметрами.

Процент положительных ядер по Ki67 в опухолевых клетках подсчитывали с применением 40x увеличения для каждого внутреннего сектора и опухоли, как описано Santos и др. (13,14), что включено в настоящий документ в качестве ссылки. Суммарно 200 клеток на внутренний сектор и 800 клеток на опухоль были проанализированы и вычислен процент положительного ответа. Подсчет выполняли

с помощью двух экспертов. Результаты сравнивали для выявления каких-либо взаимосвязей и корреляций с клинико-патологическими параметрами.

Ф. Статистический анализ

Экспрессию NQO1 и P450R сравнивали со следующими клинико-патологическими параметрами: стадия опухоли, степень дифференцировки опухоли, гипоксия опухоли (экспрессия Glut-1) и пролиферация. Статистический анализ выполнили с применением пакета программного обеспечения SPSS, версия 11,0 (SPSS Inc., Чикаго, ИЛ). Из-за того что экспрессия не является нормально распределенной, в иммуногистохимическом исследовании средние значения экспрессии для каждой категории рассчитывали как медианы с интерквартильными отклонениями. Различия между независимыми переменными определяли с помощью U теста Манна-Уитни. При двустороннем анализе достоверными считали различия при значениях P менее чем 0,05.

II. Результаты

А. Взаимосвязь между уровнями белка NQO1, стадией опухоли и степенью дифференцировки опухоли.

NQO1 был локализован цитоплазматически в эпителии опухолей мочевого пузыря всех патологических степеней дифференцировки и стадий и экспрессия NQO1 варьировала между опухолями. (Фиг.1, Таблица 1). Во многих случаях профиль гетерогенной экспрессии NQO1 наблюдал в одной и той же опухоли с областями высокой и низкой экспрессии NQO1 в одном и том же образце (данные не показаны). NQO1 был экспрессирован в опухолях всех патологических стадий (pT_0 , pT_1 , $\geq pT_2$), хотя уровни экспрессии NQO1 варьировали между различными стадиями (Таблица 1). Достоверное различие в уровне экспрессии NQO1 было обнаружено между поверхностными опухолями (pT_0+pT_1) и опухолями с инвазией в мышечный слой ($>pT_2$) с достоверно сниженной экспрессией в опухолях с инвазией в мышечный слой ($P=0,02$). Обратная зависимость экспрессии NQO1 со способностью опухоли к инвазии дополнительно была подкреплена достоверным различием в экспрессии, обнаруженной между неинвазивными (pT_0) и инвазивными ($pT_1+\geq pT_2$) опухолями ($P=0,03$). Все патологические степени дифференцировки ТСС экспрессировали NQO1 (Таблица 1). Экспрессия NQO1 была достоверно выше в опухолях со степенью дифференцировки 2 по сравнению и со степенью дифференцировки 3 (Таблица 1). Достоверных различий между высокодифференцированными (степень дифференцировки 1) и низкодифференцированными (степень дифференцировки 3) опухолями обнаружено не было (Таблица 1).

В. Взаимосвязь между экспрессией белка P450R, стадией опухоли и степенью дифференцировки опухоли.

Все исследуемые опухоли экспрессировали заметные уровни P450R, локализованного цитоплазматически. В отличие от NQO1 P450R экспрессия, как правило, была равномерной внутри опухоли. Типичное иммуноокрашивание представлено на фиг.1. P450R был экспрессирован на всех стадиях ТСС (Таблица 1). Уровни P450R были достоверно выше в опухолях с инвазией в мышечный слой ($\geq pT_2$) по сравнению с поверхностными (pT_0+pT_1) опухолями ($P<0,01$). В отличие от NQO1 экспрессия P450R показывает положительную зависимость с увеличением опухолевой стадии, но не показывает ассоциацию со способностью опухоли к инвазии, что очевидно при отсутствии достоверной разницы между инвазивными ($pT_1+\geq pT_2$) и неинвазивными (pT_0) опухолями (Таблица 1). P450R был экспрессирован при всех патологических степенях дифференцировки ТСС

(Таблица 1). Положительная корреляция была обнаружена между уровнем P450R и снижением степени дифференцировки опухоли (Таблица 1).

С. Зависимость между Glut-1 и стадией опухоли и степенью дифференцировки опухоли

5 Экспрессия белка Glut-1 была гетерогенна как в отдельных опухолевых образцах, так и между отдельными образцами одного пациента. Типичное иммуноокрашивание и его зависимость со стадией опухоли и степенью дифференцировки опухоли представлены на фиг.1 и в таблице 1 соответственно.

10 Белок Glut-1 был экспрессирован на всех опухолевых стадиях и при всех степенях дифференцировки опухоли, которые исследовали, однако уровни Glut-1 были достоверно выше в опухолях $>pT2$ (относительно опухолей pTa , $P=0,05$) и опухолях со степенью дифференцировки 3 (относительно опухолей и со степенью дифференцировки 1 [$P=0,03$] и со степенью дифференцировки 2 [$P<0,01$]). Кроме того,

15 статистически достоверные различия ($P=0,02$), существующие между неинвазивными (pTa) и инвазивными ($pT1+\geq pT2$) опухолями, предполагают, что инвазивные заболевания ассоциированы с высокой экспрессией белка Glut-1 и, следовательно, с высокими степенями гипоксии.

20 D. Зависимость между Ki67, стадией опухоли, степенью дифференцировки опухоли и энзимологией.

Степени экспрессии антигена Ki67 применяли в качестве индикатора опухолевого пролиферативного индекса (Таблица 1). Как и следовало ожидать, достоверную корреляцию наблюдали между увеличением стадии дифференцировки опухоли

25 (уменьшением степени дифференцировки) и пролиферативным индексом ($P<0,01$). Зависимости между опухолевой пролиферацией и способностью опухоли к инвазии (pTa против $pT1+\geq pT2$) обнаружено не было. Напротив, опухолевая пролиферация была достоверно выше в опухолях с инвазией в мышечный слой ($\geq pT2$) по сравнению с поверхностными опухолями ($pTa+pT1$ [$P<0,01$]), что возможно

30 как результат взаимосвязи между инвазией в мышечный слой и высокой стадией дифференцировки опухоли. Интересно, что достоверная зависимость была обнаружена между опухолевым пролиферативным индексом и экспрессией как Glut-1 ($P=0,01$), так и P450R ($P<0,01$), но не обнаружена с экспрессией NQO1.

35 Результаты данного исследования показывают, что белковая экспрессия ключевых ферментов связана с биоредуктивной активацией соединений на основе хинона и наличием гипоксии, что определено посредством уровней белка Glut-1, изменяющихся со стадией степенью дифференцировки ТСС мочевого пузыря.

40 Наиболее поразительным наблюдением является тот факт, что экспрессия белка NQO1 достоверно снижается с увеличением опухолевой стадии (Таблица 1). Что касается степени дифференцировки опухоли, существуют также свидетельства, что опухоли G3 имеют более низкие уровни NQO1, чем опухоли G2 (но не G1). Данные наблюдения находятся в соответствии с ранее опубликованными работами,

45 где была описана обратная зависимость между экспрессией мРНК NQO1 и возрастанием опухолевой стадии (15). Аналогичным образом для Glut-1 увеличение белковой экспрессии со стадией дифференцировки опухоли ($P=0,03$ и $<0,01$, где G1 и G2 сравнивали с опухолями G3 соответственно) и опухолевой стадией ($P=0,05$, когда опухоли pTa сравнивали с опухолями $\geq pT2$) согласуется с предыдущими

50 публикациями (16). В отличие от ранее опубликованных работ, демонстрирующих более высокие уровни мРНК P450R в поверхностных ТСС по сравнению с инвазивными в мышечный слой (15), в данной работе белковые уровни P450R были

достоверно выше для заболеланий с инвазией в мышечный слой ($\geq pT2$ по сравнению с $pTa+pT1$) ($P<0,01$). Кроме того, белковая экспрессия P450R показывает положительную корреляцию с увеличением стадии дифференцировки (уменьшением степени дифференцировки) (Таблица 1). Интересно, что экспрессия P450R также демонстрирует выраженную положительную корреляцию с индексом пролиферации ($P<0,01$), возможно, как следствие значительной зависимости между P450R, Ki67 и увеличением стадии дифференцировки опухоли (снижения степени дифференцировки). Как бы то ни было, следует иметь в виду, показано, что оценивание биоредуктивного лечения, в которое вовлечен P450R, с высоким пролиферативным индексом связано с неблагоприятным прогнозом при раке мочевого пузыря (17,18). Таким образом, исходя из анализа белковой экспрессии с помощью иммуногистохимии предполагается, что гипоксия, как показано посредством экспрессии Glut-1, связана со стадией опухоли, степенью дифференцировки опухоли и опухолевой инвазией. В отношении опухолевой энзимологии данное исследование предполагает, что уровни NQO1 достоверно снижаются как результат увеличения опухолевой стадии (и способности к инвазии), тогда как уровни P450R увеличиваются со стадией дифференцировки опухоли и способностью к инвазии.

Полученные результаты имеют важное значение для возможного терапевтического планирования с применением биоредуктивных лекарственных веществ на основе хинона в лечении ТСС мочевого пузыря. Большое количество данных, полученных на доклинических испытаниях, свидетельствует, что ответ клеток на MMC, EO9 и RH1 зависит не только от уровней NQO1, но также от степени опухолевой гипоксии. В отношении MMC роль NQO1 в определении клеточного ответа в аэробных условиях является противоположной, но в условиях гипоксии достоверное усиление активности происходит только в клетках, которые имеют низкую активность NQO1 или не имеют ее (19). В случае EO9 и RH1 схожие результаты получены в условиях гипоксии со значительным усилением активности, наблюдаемой только в клетках с низким NQO1 (20, 21). Однако в аэробных условиях существует хорошая корреляция между активностью NQO1 и чувствительностью к химиокомпозициям, которая свидетельствует, что в присутствии кислорода NQO1 играет заметную роль в активации EO9 и RH1 (22, 23). Основы механизмов, объясняющих подобные результаты, не ясны (24), но в условиях гипоксии одноэлектронные редуктазы, такие как P450R, имеют более существенное значение в процессе биоредуктивной активации (25). На основании данных результатов такие соединения, как EO9 и RH1, могли бы поражать аэробную фракцию NQO1 богатых опухолей (и таким же образом мог бы MMC, но в меньшей степени) или гипоксическую фракцию NQO1 дефицитных опухолей, допуская, что присутствуют одноэлектронные редуктазы, такие как P450R. Таким образом, в случае NQO1 богатых опухолей было бы целесообразным применение соединений, таких как EO9 и RH1, в качестве отдельных композиций, нацеленных на аэробную фракцию. Для NQO1 дефицитных опухолей со значительной гипоксической фракцией данные композиции следует применять в сочетании с лучевой терапией или другими химиотерапевтическими средствами, которые нацелены на аэробную фракцию. Результаты данного исследования предполагают, что данная вторая стратегия может быть эффективной в случае более поздней ТСС мочевого пузыря (т.е. $\geq pT2$) или более агрессивного заболелания (т.е. опухолей со стадией дифференцировки 3), т.к. они, как правило, имеют низкую экспрессию белка NQO1 (и, возможно, более

высокую экспрессию P450R) и включают значительные области гипоксии. В данном конкретном аспекте интересно заметить, что обнадеживающие результаты были получены для рака мочевого пузыря с инвазией в мышечный слой с применением химиотерапии и лучевой терапии (Митомицин С плюс 5-Фторурацил в сочетании с радикальной лучевой терапией), хотя анализ NQO1 и маркеров гипоксии не был включен при планировании данного исследования (26). В широком смысле, демонстрация в данном и других исследованиях, что как поверхностная, так и инвазивная в мышечный слой ТСС мочевого пузыря имеют значительные районы гипоксии, предполагает, что данные опухоли являются эффективными кандидатами для оценки других биоредуктивных лекарственных веществ или терапии, связанной с гипоксией.

В заключение, результаты данного исследования показывают, что белковая экспрессия ключевых ферментов вовлечена в биоредуктивную активацию лекарственных веществ на основе хинона и наличия гипоксических нарушений как показателя опухолевой стадии и степени дифференцировки ТСС мочевого пузыря. Подобные результаты предполагают, что данные опухоли (т.е. опухоли >pT2 и G3) могли бы быть хорошими кандидатами для терапевтических схем химиотерапии и лучевой терапии с применением хинонов (например, ММС, ЕО9 и RH1) для направленного действия на гипоксическую фракцию в сочетании с радиацией или другими химиокомпозициями для воздействия на аэробную фракцию клеток. На основании данных аргументов и возвращаясь к фиг.1 случай А (pT2, G3) показывает низкие NQO1, высокие P450R и высокие Glut-1 уровни и таким образом может являться хорошим кандидатом для химиотерапии совместно с лучевой терапией и с применением хинонов. Случай В (pTa, G1) имеет высокий NQO1, низкий P450R и средний Glut-1 и также должен хорошо отвечать на химиотерапию на основе хинонов. Также можно предполагать, что случай С (pT1, G2), который показывает средний NQO1, средний P450R и средний Glut-1, хорошо ответит на химиотерапию на основе хинонов. Исследование профиля опухолей у конкретных пациентов для данных маркеров остается важным, в частности, в свете существующей выраженной гетерогенности между пациентами (в частности, для NQO1).

Как применяют в настоящем документе, когда используют уровни ферментов для определения соответствующего лечения пациента, "высокие" относительно "низких" уровней ферментов можно установить посредством сравнения уровней интересующего фермента соответствующей опухоли с другими опухолями от одного и того же пациента, с опухолями от другого пациента и/или со стандартными линиями опухолевых клеток или другими доступными опорными точками, известными специалистам в данной области. Таким образом, "высокие" и "низкие" уровни можно определять посредством лечащего врача или другой лаборатории, исследования или лечащего персонала, которые включены в измерение и/или количественную оценку уровня ферментов опухоли у конкретного пациента.

Пример 2

I. Материалы и методы

A. Приборы и общие принципы исследования

Как показано на фиг.2, аппаратура, применяемая в описанном эксперименте, включает в себя трансэчечную вставку (Costar), вставленную в одну лунку 24-луночного планшета для культур. Вставка имеет мембрану, покрытую коллагеном, на своей основе и таким образом формирует одновременно барьер между верхним и нижним отделом, а также поверхность, на которой клетки могут прикрепляться и

расти. Клеточной линией, которую использовали в данном исследовании, была линия клеток человеческой аденокарциномы толстого кишечника DLD-1, которую выбрали вследствие ее способности формировать плотные контакты между клетками, формируя таким образом 'барьер', через который должно проходить лекарственное вещество. Для определения проницаемости лекарственного вещества лекарственные вещества добавляли в верхний отдел и определяли концентрацию лекарственного вещества через определенные промежутки времени.

В. Условия для клеточных культур

Клетки DLD-1 по стандартной методике культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, пирувата натрия (1 мМ), L-глутамина (2 мМ), пенициллина/стрептомицина (50 МЕ/мл, 50 мкг/мл) и помещенного в буфер HEPES (25 мМ).

Клетки DLD-1 ($2,5 \times 10^5$ в 200 мкл среды) добавляли в верхнюю камеру и оставляли для размещения и прикрепления к мембране в течение приблизительно 3 часов при 37°C в атмосфере, обогащенной CO₂ (5%). Когда клетки прикрепилась, вставку между лунками поместили в одну лунку 24 луночного планшета и добавили в верхнюю камеру 600 мкл среды. Аппарат затем инкубировали при 37°C в течение 4 суток с ежедневной заменой среды как в верхней, так и в нижней камере. На основании предыдущих исследований толщина многослойного слоя после 4 суток культивирования равнялась приблизительно 50 мкм. Для каждого теста 3 вставки между лунками удаляли для гистологического исследования и тщательно определяли толщину и целостность (см. ниже более подробно).

С. Приготовление растворов лекарственных веществ

Следующие растворы готовили по описанным ниже процедурам, которые суммированы в фиг.3.

1. Раствор 1: EO9 (347 мкМ) в 0,1% DMSO

Твердый EO9 растворили в 100% DMSO для получения стокового раствора с концентрацией 347 мМ. 10 мкл стокового раствора добавили в 10 мл полной среды RPMI (фенол красный свободный). В целях предотвратить возможную преципитацию EO9 добавление стокового раствора EO9 в среду проводили с продолжительным встряхиванием. Конечная концентрация EO9 была 347 мкМ, которая эквивалентна 4 мг/40 мл.

2. Раствор 2: EO9 (347 мкМ) в 10% ПГ

Двести миллиграмм бикарбоната натрия (NaHCO₃) растворили в 4 мл раствора EDTA (0,5 мг/мл, который был свежеприготовлен из 0,5 М стокового раствора Sigma). Раствор затем смешали с 6 мл раствора ПГ (2 мл ПГ+4 мл H₂O) с получением конечного объема 10 мл, содержащего 20% ПГ. Данный раствор добавили в 20 мл универсальную трубку, содержащую EO9 (2 мг), бикарбонат натрия (5 мг) и маннит (12,5 мг). Раствор инкубировали при 37°C с продолжительным встряхиванием до тех пор, пока EO9 полностью не растворился (приблизительно 5-6 часов). Затем раствор развели с водой в соотношении 1:1 для получения 10% ПГ раствора.

3. Раствор 3: EO9 (347 мкМ) в 20% ПГ

Двести миллиграмм бикарбоната натрия (NaHCO₃) растворили в 4 мл раствора EDTA (0,5 мг/мл, который был свежеприготовлен из 0,5 М стокового раствора Sigma). Раствор затем смешали с 6 мл раствора ПГ (2 мл ПГ+4 мл H₂O) с получением конечного объема 10 мл, содержащего 40% ПГ. Данный раствор добавили в 20 мл универсальную трубку, содержащую EO9 (2 мг), бикарбонат

натрия (5 мг) и маннит (12,5 мг). Раствор инкубировали при 37°C с продолжительным встряхиванием до тех пор, пока EO9 полностью не растворился (приблизительно 3-4 часа). Затем раствор развели с водой в соотношении 1:1 для получения 20% ПГ раствора.

5 4. Раствор 4: EO9 (347 мкМ) в 30% ПГ

Двести миллиграмм бикарбоната натрия (NaHCO_3) растворили в 4 мл раствора EDTA (0,5 мг/мл, который был свежеприготовлен из 0,5 М стокового раствора Sigma). Раствор затем смешали с 6 мл раствора ПГ (2 мл ПГ+4 мл H_2O) с получением конечного объема 10 мл, содержащего 60% ПГ. Данный раствор добавили в 20 мл универсальную трубку, содержащую EO9 (2 мг), бикарбонат натрия (5 мг) и маннит (12,5 мг). Раствор инкубировали при 37°C с продолжительным встряхиванием до тех пор, пока EO9 полностью не растворился (приблизительно 2 часа). Затем раствор развели с водой в соотношении 1:1 для получения 30% ПГ раствора.

15 D. Введение лекарственного вещества

Для всех без исключения процедур среду применяли, как описано выше, кроме факта, когда применяли фенол красный свободный (фенол красный элюируется очень близко к EO9 на хроматограмме). EO9 добавили в верхнюю камеру при $t=0$ в объеме 100 мкл и нижняя камера содержала 600 мкл среды (постоянно перемешивая). После 10 минут инкубации при 37°C вставку между лунок удалили и поместили в новую лунку 24-луночного планшета, содержащую 600 мкл свежей среды. Раствор лекарственного вещества в верхней камере удалили и поместили 100 мкл свежего раствора лекарственного вещества (т.е. концентрацию в верхней камере поддерживали постоянной). Данную процедуру повторяли целиком с 10 минутными интервалами в течение суммарного периода времени 1 час.

25 E. Процедуры выделения

30 EO9 немедленно экстрагировали с применением картриджей Isolute C18 SPE. Перед добавлением образца (500 мкл) картриджи залили 1 мл метанола, затем промыли в 1 мл деионизированной воды. После дополнительной промывки в 1 мл деионизированной воды EO9 растворили в 300 мкл метанола. Образцы высушили под вакуумом (при комнатной температуре в роторном испарителе) и хранили при -20°C, пока не потребуется для анализа или восстанавливали в подвижной фазе (см. ниже) для немедленного анализа.

35 F. HPLC анализ

Хроматографический анализ EO9 выполняли, как описано Phillips и др. (British Journal of Cancer. 65(3):359-64, 1992), что включено в настоящий документ в качестве ссылки. В кратком изложении, для разделения применяли колонку Nichrom RPB (25 см × 4,6 мм id, Nichrom Ltd, UK). Водный 996 фотодиодный матричный детектор ($\lambda_1=280$ нм) с программным обеспечением Masslynx 3.4 (Micromass Ltd) применяли для спектрального анализа интересующих пиков. Подвижная фаза состояла из 1M фосфатного буфера (1%), метанола (42%) и HPLC градиентной воды (57%). Скорость потока установили на 1,2 мл мин⁻¹ с применением хроматографической системы с насосом для четырех компонентов Waters Alliance 2690 (Milford, MA, USA), в которую также включен автоматический пробозабор. Пределом детекции было 10 нг/мл (34,7 нМ).

50 G. Гистология

Для каждого эксперимента 3 были подобраны три вставки между лунками; 1 контрольная и 2 в конце эксперимента. Каждую вставку между лунками фиксировали

в 10% формалине в течение одного часа перед перенесением в 70% этанол и оставляли на всю ночь. Используя чистый скальпель, мембраны тщательно отделяли от пластиковой вставки и обрабатывали для заливки в парафиновый воск с использованием стандартных процедур, известных специалистам в данной области. Образцы нарезали (5 мкм) с использованием роторного микротомы Leitz, помещали на покрытые белком предметные стекла, окрашивали с помощью гематоксилина и эозина, также используя стандартные процедуры, известные специалистам в данной области. Толщину многослойного слоя измеряли, используя окулярную шкалу, которую калибровали с применением многоступенчатого микрометра. На каждом срезе получали пять измерений и на образец измеряли 3 среза.

II. Результаты

A. Типичные хроматограммы

На фиг.4 показана хроматограмма отрицательного контроля, меченного внутренним стандартом WV14 (время удерживания=11,059 минут). Пик на 6,870 минут является пиком, соответствующим контаминации. На фиг.5 показаны стандарты EO9 (1 мкг/мл (фиг.5A) и 20 нг/мл (фиг.5B)) в среде для культивирования RPMI 1640. Как представлено на фиг.5A, пики EO9 и WV14 элюируют при 8,029 минутах и 13,023 минутах соответственно (пик на 7,292 мин является пиком, соответствующим контаминации, что описано выше). Следует отметить, что время удерживания может сдвигаться вследствие температурных отклонений в лаборатории, но что отношение времени удерживания должно оставаться постоянным. Фиг.5B показывает предел детекции. На фиг.6 показаны хроматограммы стандартов EO9 в 0,1% DMSO (фиг.6A); 30% ПГ (фиг.6B); 20% ПГ (фиг.6C) и 10% ПГ (фиг.6D).

B. Калибровочные кривые

Калибровочные кривые были построены для каждого приготовления EO9 и результаты представлены на фиг.7. Калибровочные кривые были воспроизводимы и показаны незначительные различия в наклоне каждой калибровочной кривой, как видно из фиг.7. Причины данных различий не ясны, но могут отражать небольшие отличия в эффективности экстракции между различными приготовлениями. Эффективность экстракции для EO9 в 0,1% DMSO, 10% ПГ, 20% ПГ и 30% ПГ составляли 92,3%, 81,7%, 79,9% и 81,1% соответственно. Вследствие данной вариации калибровочные кривые были построены для каждого проделанного эксперимента. Заметных признаков продуктов деградации на какой-либо хроматограмме не обнаружено.

C. Проницаемость лекарственного вещества

Как видно из фигуры 8, с увеличением концентрации ПГ степень проницаемости EO9 через многослойный слой уменьшается. В отношении EO9 в 0,1% DMSO кинетика является линейной, что является ожидаемым, когда концентрация в верхней камере поддерживается на более или менее постоянном уровне. Важно отметить, что при двух максимальных концентрациях анализируемого ПГ кинетика является недостаточно линейной - существует постепенное увеличение в скорости с увеличением времени. Подобный эффект возможно отражает изменения в толщине многослойного слоя в результате действия ПГ (см. фигуру 9). Заметных признаков метаболитов или продуктов деградации в какой-либо оцениваемый момент времени не обнаружено.

На фиг.9 показаны результаты гистологического исследования, проведенного для тестирования проницаемости EO9 через многослойные слои DLD-1. Толщина

срезом, обработанным нелекарственным веществом, была $56,01 \pm 3,63$ мкм. После одного часа обработки EO9 в 0,1% DMSO толщина многоклеточного слоя достоверно не отличалась от образцов, обработанных нелекарственным веществом ($58,80 \pm 2,50$ мкм). Однако после обработки EO9 в 30% ПГ толщина многоклеточного слоя достоверно уменьшилась до $29,01 \pm 1,78$ мкм. Также выраженные морфологические изменения по внешнему виду появились внутри слоя, наиболее заметным из которых было появление 'изломов' или 'туннелей' в самом слое. Наблюдение, полученное на протяжении экспериментов с использованием EO9 в ПГ, заключалось в том, что верхняя камера содержала больше жидкости, чем ожидалось. Например, после 10 мин инкубации с EO9 в ПГ при 30%, 20% и 10% объеме, полученный из верхней камеры, составлял 106 ± 3 , 107 ± 3 и 105 ± 2 мкл соответственно (после одного часа воздействия EO9 в 0,1% DMSO полученный объем составлял 98 ± 2 мкл). Следует подчеркнуть, что данные объемы являются только приблизительными (на основании того, что может быть забрано, используя пипетку Gilson), но они действительно показывают, что объем среды в верхней камере изменяется, когда применяют EO9, растворенный в составах ПГ (особенно при 30% ПГ). Также следует заметить, что гистологические изображения показывают, что клетки находятся в тесном контакте с базальной мембраной в контролях и образцах, обработанных EO9 (0,1% DMSO), но в многоклеточном слое, обработанном EO9 в 30% ПГ, существует небольшой, но отчетливый промежуток между многоклеточным слоем и самой мембраной.

Ссылки

1. Cancer Research UK, Bladder cancer - UK. London, 2002.
2. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, et al. The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. *J Urol* 1996; 155:1233-8.
3. Sartorelli AC, Hodnick WF, Belcourt MF, et al. Mitomycin C: a prototype bioreductive agent. *Oncol Res* 1994; 6:501-8.
4. Ross D, Beall HD, Siegel D, Traver RD, Gustafson DL. Enzymology of bioreductive drug activation. *Br J Cancer* 1996; Suppl 27:S1-8.
5. Wardman P, Dennis MF, Everett SA, Patel KB, Stratford MR, Tracy M. Radicals from one-electron reduction of nitro compounds, aromatic N-oxides and quinones: the kinetic basis for hypoxia-selective, bioreductive drugs. *Biochem Soc Symp* 1995; 61:171-94.
6. Workman P, Stratford IJ. The experimental development of bioreductive drugs and their role in cancer therapy. *Cancer Met Rev* 1993; 12:73-82.
7. Puri R, Basu S, Loadman P, et al. Phase I clinical evaluation of intravesical EOquin (EO9) against superficial bladder cancer: Preliminary results. *Clinical Cancer Res* 2003; 9:6248S-9S.
8. Danson S, Ward TH, Butler J, Ranson M. DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:437-49.
9. Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, Wilson GD. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer* 2003; 89:1290-7.
10. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding, *Int J Cancer* 2003; 104:85-91.
11. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001; 195: 72-9.
12. Basu S, Brown JE, Flannigan GM, et al. Immunohistochemical analysis of NAD(P)H:

quinone oxidoreductase and NADPH cytochrome P450 reductase in human superficial bladder tumors: relationship between tumor enzymology and clinical outcome following intravesical mitomycin C therapy, *Int J Cancer* 2004; 109:703-9.

5 13. Santos L, Amaro T, Costa C, et al. Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification, *Int J Cancer* 2003; 105: 267-72.

10 14. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29:74-80.

15 15. Li D, Gan Y, Wientjes MG, Badalament RA, Au JL. Distribution of DT-diaphorase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: cytochrome p450 oxidoreductase in bladder tissues and tumors. *J Urol* 2001; 166:2500-5.

16. Chang S, Lee S, Lee C, Kim JI, Kim Y. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2000; 55:448-52.

17. Blanchet PDS, Eschwege P, Viellefond A, et al. Prospective evaluation of Ki-67 labeling in predicting the recurrence and progression of superficial bladder transitional cell carcinoma. *Eur Urology* 2001; 40:169-75.

20 18. Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 2000; 88:2598-605.

25 19. Plumb JA, Workman P. Unusually marked hypoxic sensitization to indoloquinone EO9 and mitomycin C in a human colon-tumor cell line that lacks DT-diaphorase activity, *Int J Cancer* 1994; 56:134-9.

20. Plumb JA, Gerritsen M, Workman P. DT-diaphorase protects cells from the hypoxic cytotoxicity of indoloquinone EO9. *Br J Cancer* 1994; 70:1136-43.

30 21. Kim JY, Patterson AV, Stratford IJ, Hendry JH. The importance of DT-diaphorase and hypoxia in the cytotoxicity of RH1 in human breast and non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 2004; 15:71-7.

22. Fitzsimmons SA, Workman P, Grever M, Paull K, Camalier R, Lewis AD. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:259-69.

35 23. Dehn DL, Winski SL, Ross D. Development of a new isogenic cell-xenograft system for evaluation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-directed antitumor quinones: evaluation of the activity of RH1. *Clinical Cancer Res* 2004; 10:3147-55.

40 24. Workman P. Enzyme-directed bioreductive drug development revisited: a commentary on recent progress and future prospects with emphasis on quinone anticancer agents and quinone metabolizing enzymes, particularly DT-diaphorase. *Oncol Res* 1994; 6:461-75.

25. Belcourt MF, Hodnick WF, Rockwell S, Sartorelli AC. Differential toxicity of mitomycin C and porfiromycin to aerobic and hypoxic Chinese hamster ovary cells overexpressing human NADPH cytochrome c (P-450) reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:456-60.

45 26. Hussain SA, Stocken DD, Peake DR, et al. Long-term results of a phase II study of synchronous chemoradiotherapy in advanced muscle invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 2004, 90:2106-11.

Таблица 1

Экспрессия белков NQO1, P450R, GLUT-1 и Ki67 в ТСС мочевого пузыря человека. Данные для NQO1, P450R и GLUT-1 представлены в виде среднего значения (\pm интерквартильное отклонение) от двух экспертов. Данные для пролиферативного индекса представлены в виде среднего значения \pm С.О. от двух экспертов. Образцы классифицированы от 0 до 4 для NQO1, P450R и GLUT-1 и пролиферативный индекс рассчитан как % положительного ответа Ki67, как описано в "Материалах и методах"

	Количество образцов	Среднее значение экспрессии NQO1 (\pm интерквартильное отклонение)	Среднее значение экспрессии P450R (\pm интерквартильное отклонение)	Среднее значение экспрессии GLUT-1 (\pm интерквартильное отклонение)	% пролиферации (Ki67 положительные) (\pm С.О.)	
5						
	pTa	19	2,50 (1,14-3,20)	3,20 (2,58-3,83)	2,00 (1,30-3,80)	16,75 \pm 2,8
	pT1	19	1,88 (0,33-3,00)	2,96 (2,33-3,67)	3,38 (2,75-3,88)	13,88 \pm 2,2
10	pT2	14	0,17 (0,00-1,67)	3,89 (3,75-3,92)	3,88 (2,67-4,00)	24,59 \pm 4,43
	G1	11	1,00 (0,00-1,10)	2,79 (2,77-2,92)	2,38 (2,00-3,25)	9,72 \pm 2,64
	G2	26	2,72 (1,83-3,20)	3,35 (2,75-3,83)	2,83 (1,75-3,75)	14,59 \pm 1,72
	G3	15	0,33 (0,00-1,85)	3,83 (3,31-3,92)	4,00 (3,63-4,00)	30,47 \pm 3,71
	Неинвазивный ^a	19	2,50 (1,14-3,20)	3,20 (2,58-3,83)	2,00 (1,31-3,67)	17,51 \pm 2,83
	Инвазивный ^b	33	1,67 (0,0-2,52)	3,67 (2,92-3,89)	3,50 (2,71-4,00)	19,41 \pm 2,86
15	Поверхностный ^c	38	2,00 (1,08-3,17)	3,10 (2,33-3,78)	2,83 (1,83-3,83)	15,69 \pm 1,79
	Инвазивный Мышечный слой ^d	14	0,17 (0,00-1,67)	3,89 (3,75-3,92)	3,88 (2,67-4,00)	24,59 \pm 4,43

Индексы a, b, c и d обозначают pTa; (pT1+pT2); (pTa+pT1) и pT2 опухолевые стадии соответственно

20

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для лечения рака мочевого пузыря, включающая в себя ЕО9 в растворе с концентрацией пропиленгликоля (ПГ), выбранной из группы, состоящей из приблизительно 30% объем/объем ПГ, приблизительно 20% объем/объем ПГ и приблизительно 10% объем/объем ПГ.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 от приблизительно 300 мкМ до приблизительно 400 мкМ.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией ЕО9 приблизительно 347 мкМ.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где указанная композиция дополнительно содержит NaHCO_3 , EDTA, маннит и воду.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, где указанная композиция включает в себя от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 120 мг/мл NaHCO_3 .

6. Фармацевтическая композиция по п.5, где указанная композиция включает в себя приблизительно 100 мг/мл NaHCO_3 .

7. Фармацевтическая композиция по п.5, где указанная композиция включает в себя приблизительно 50 мг/мл NaHCO_3 .

8. Фармацевтическая композиция по п.4, где указанная композиция включает в себя от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл маннита.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где указанная композиция включает в себя приблизительно 0,625 мг/мл маннита.

10. Фармацевтическая композиция по п.8, где указанная композиция включает в себя приблизительно 1,25 мг/мл маннита.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, где указанная композиция включает в себя приблизительно 100 мг/мл NaHCO_3 , приблизительно 0,625 мг/мл маннита, и приблизительно 0,1 мг/мл ЕО9 в растворе, включающим в себя ЭДТА, ПГ и воду.

12. Фармацевтическая композиция для лечения рака мочевого пузыря, включающая в себя ЕО9, NaHCO_3 и маннит, в растворе, включающем в себя ПГ, ЭДТА и воду, где указанный ПГ присутствует в указанном растворе в процентном

соотношении, выбранном из группы, состоящей из от приблизительно 6% до приблизительно 14% объем/объем; от приблизительно 16% до приблизительно 24% объем/объем и от приблизительно 26% до приблизительно 34% объем/объем.

5 13. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанный ПГ присутствует в указанном растворе в процентном соотношении, выбранном из группы, состоящей из приблизительно 10% объем/объем, приблизительно 20% объем/объем и приблизительно 30% объем/объем.

10 14. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией приблизительно 347 мкМ ЕО9 и концентрацией приблизительно 10% объем/объем ПГ.

15 15. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией приблизительно 347 мкМ ЕО9 и концентрацией 20% объем/объем ПГ.

16. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией приблизительно 347 мкМ ЕО9 и концентрацией приблизительно 30% объем/объем ПГ.

20 17. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 120 мг/мл NaHCO_3 .

18. Фармацевтическая композиция по п.17, где указанная композиция включает в себя приблизительно 100 мг/мл NaHCO_3 .

25 19. Фармацевтическая композиция по п.17, где указанная композиция включает в себя приблизительно 50 мг/мл NaHCO_3 .

20. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 3,0 мг/мл маннита.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, где указанная композиция включает в себя приблизительно 0,625 мг/мл маннита.

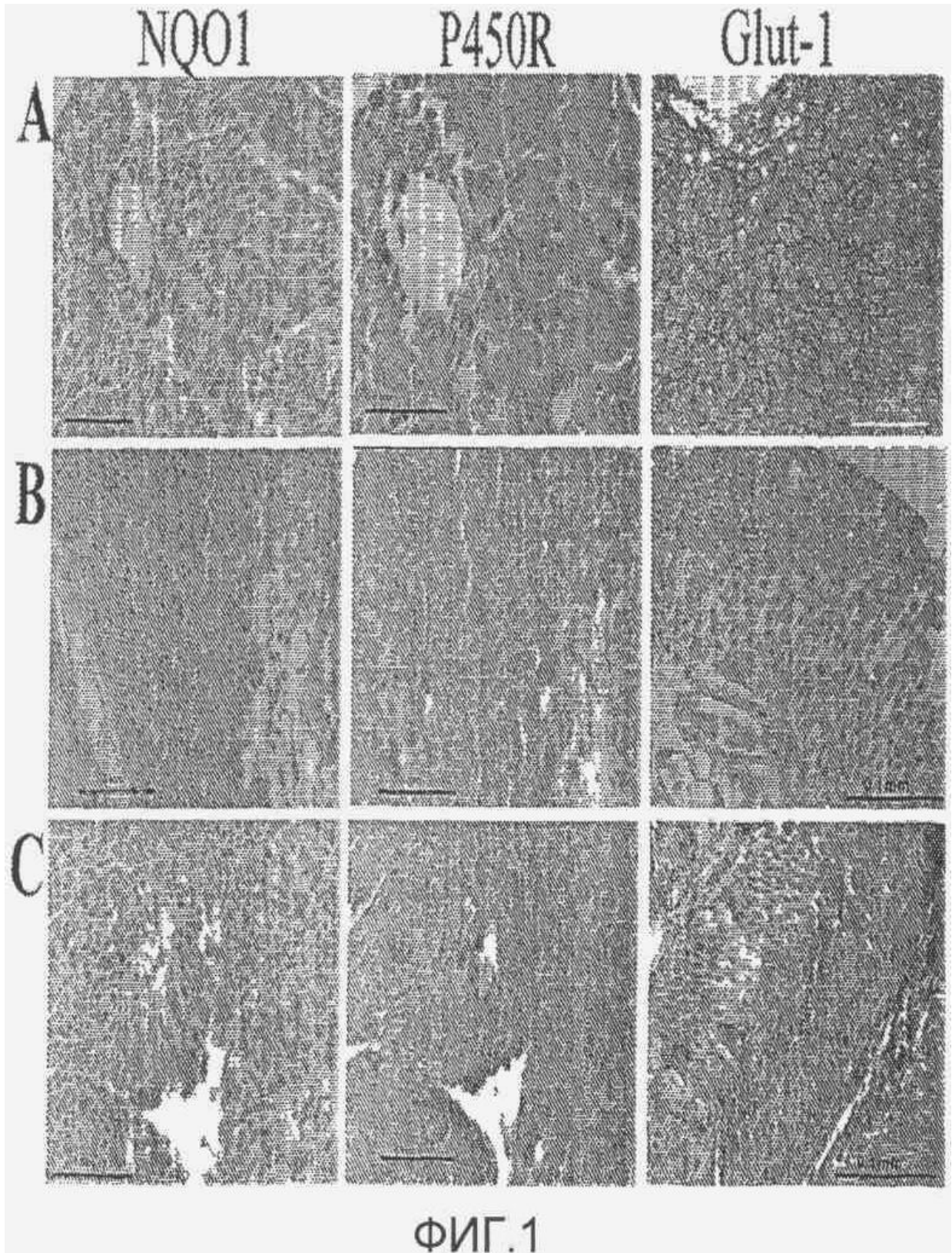
30 22. Фармацевтическая композиция по п.20, где указанная композиция включает в себя приблизительно 1,25 мг/мл маннита.

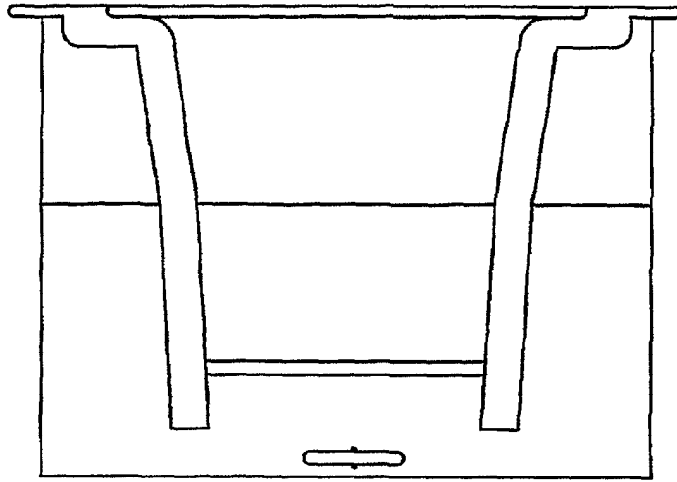
35 23. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией приблизительно 347 мкМ ЕО9, с концентрацией приблизительно 10% объем/объем ПГ, приблизительно 100,25 мг/мл NaHCO_3 и приблизительно 0,625 мг/мл маннита.

40 24. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная композиция включает в себя раствор с концентрацией приблизительно 347 мкМ ЕО9, с концентрацией приблизительно 30% объем/объем ПГ, приблизительно 100,25 мг/мл NaHCO_3 и приблизительно 0,625 мг/мл маннита.

45

50



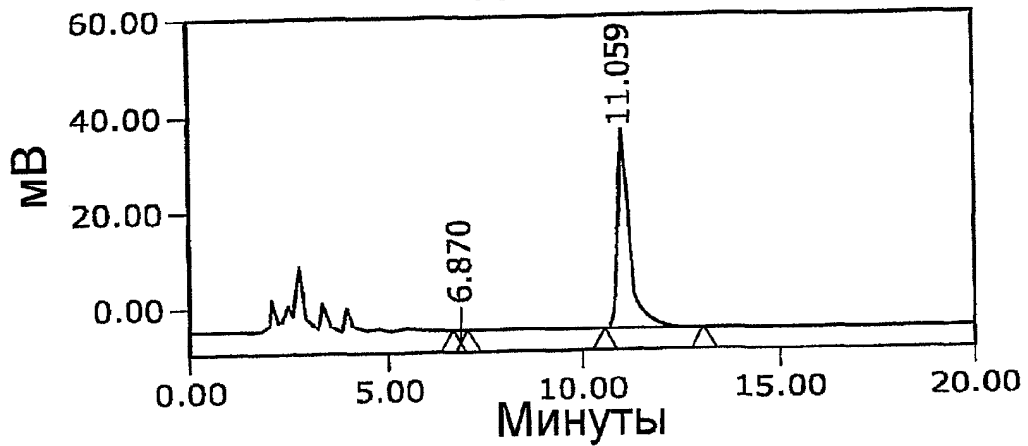


ФИГ.2

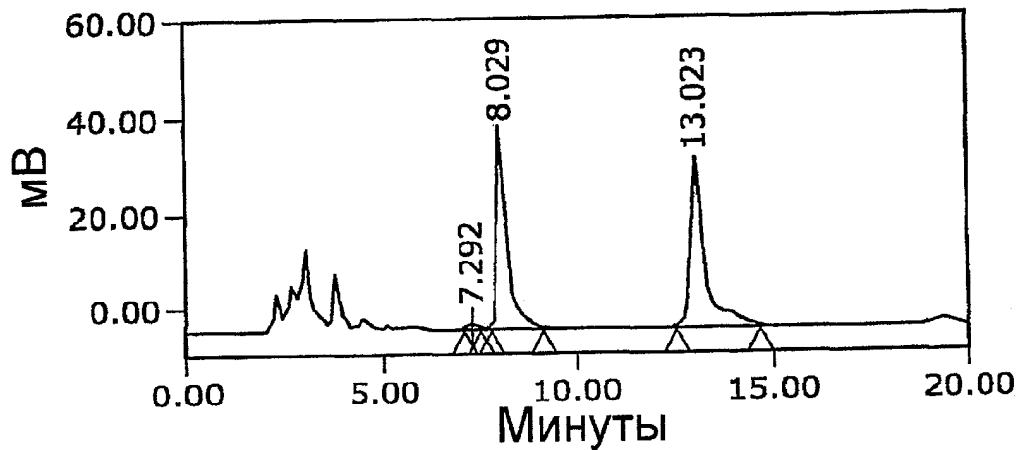
0,5 мг/мл ЭДТА	4 мл	} A	} B	} D Мешать при 37°C в течение 2-6 ч
NaHCO ₃	200 мг			
1,2-пропилдиол (ПГ)	2,4 или 6 мл			
H ₂ O соответственно	4,2 или 0 мл			
EO9	2 мг	} C		
Маннит	12,5 мг			
NaHCO ₃	5 мг			

Смесь D + WFI 1:1 Готово к использованию

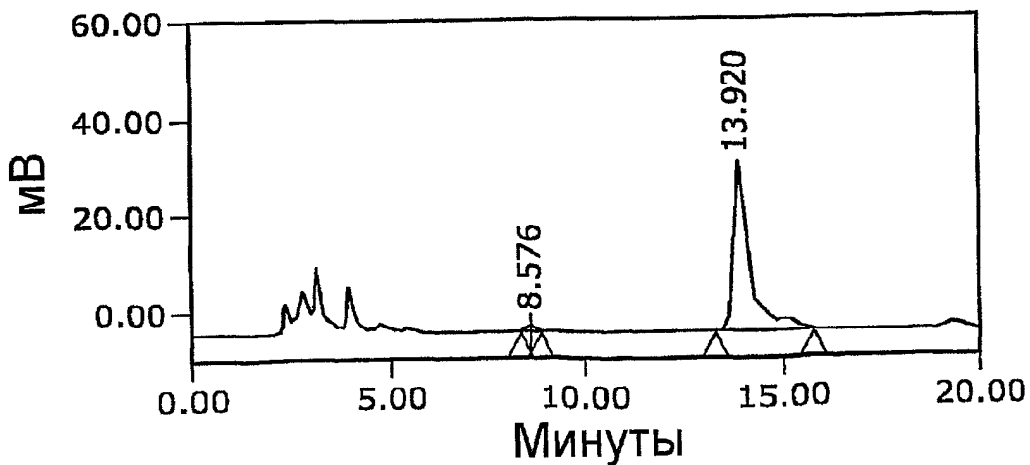
ФИГ.3



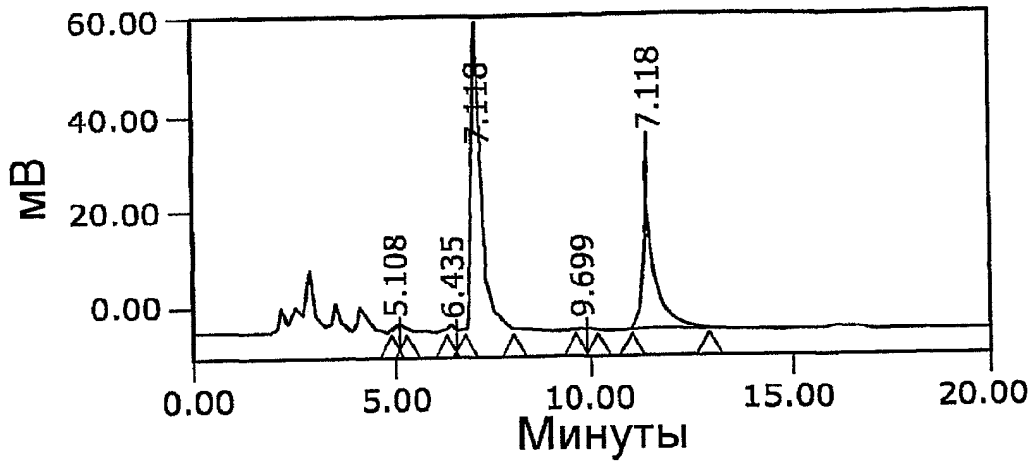
ФИГ.4



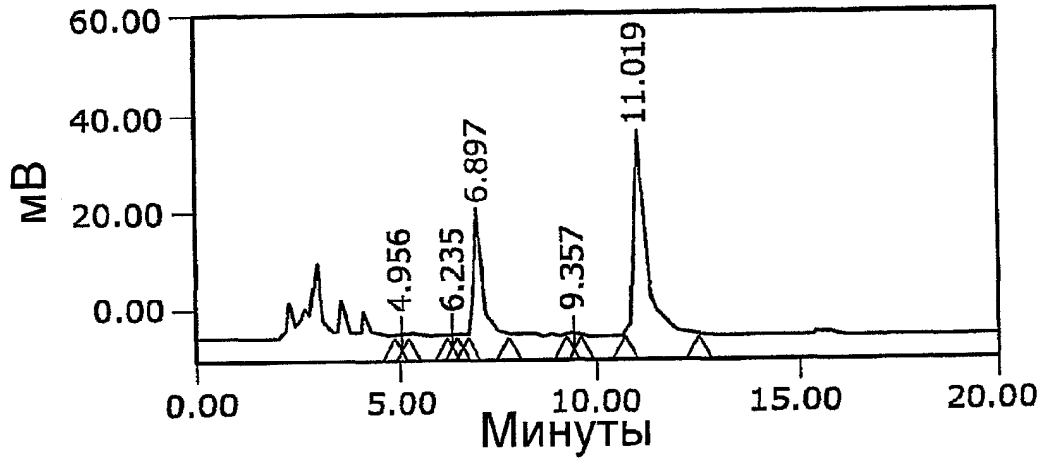
ФИГ.5А



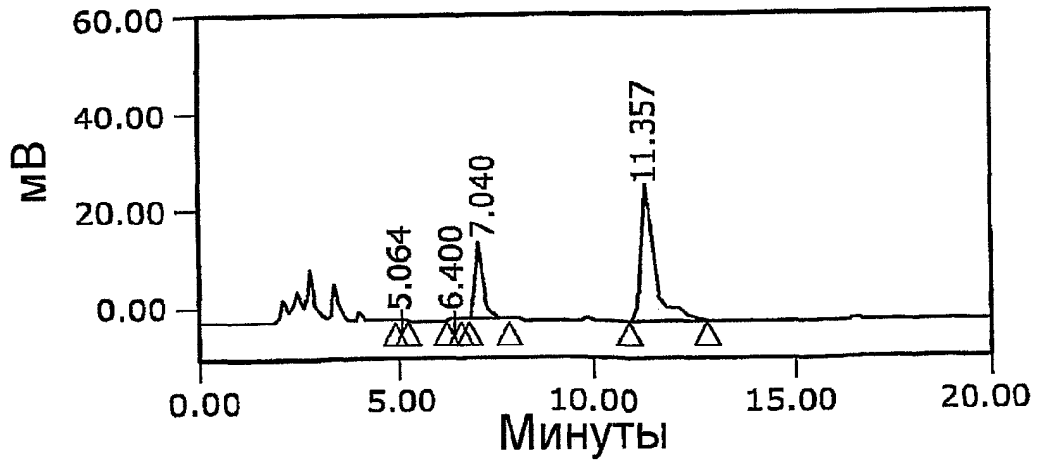
ФИГ.5В



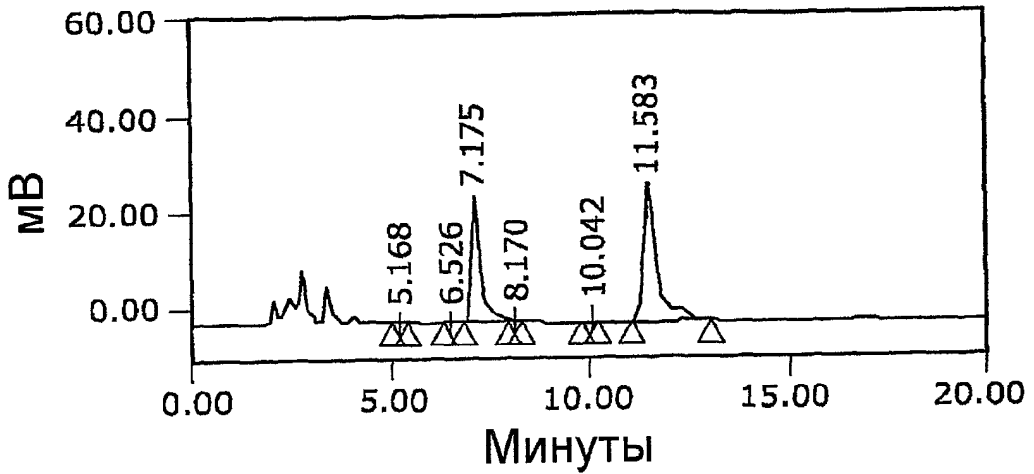
ФИГ.6А



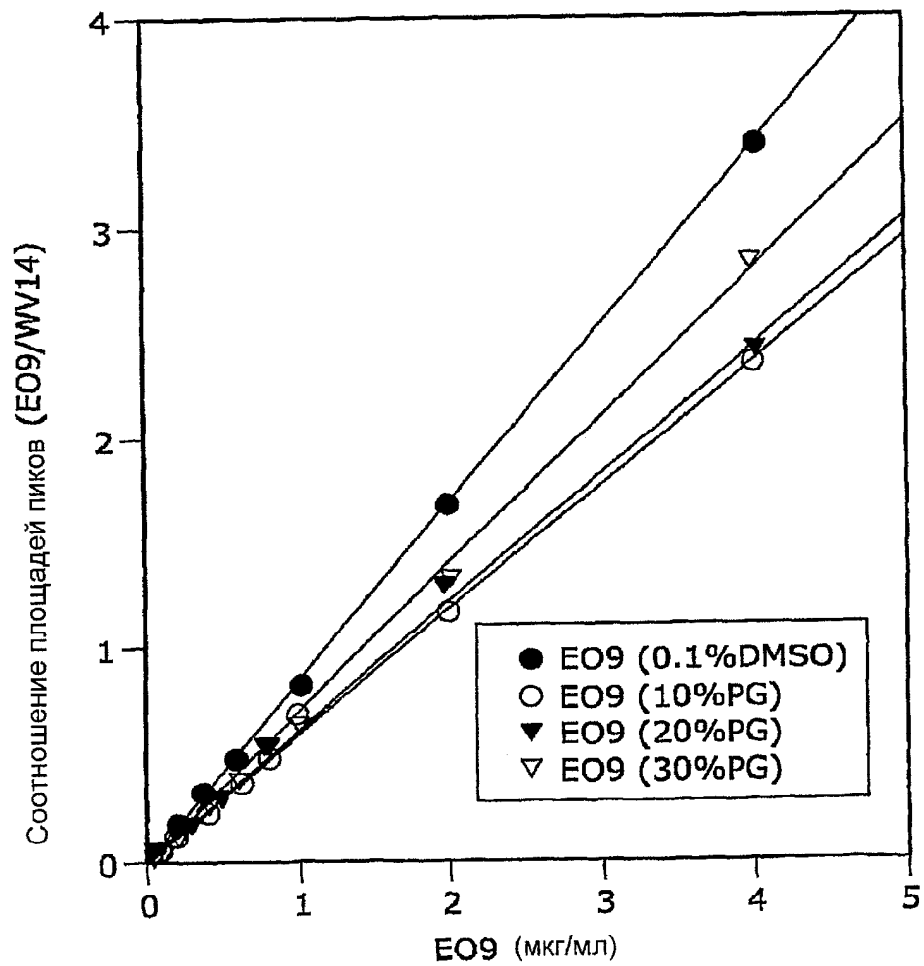
ФИГ.6В



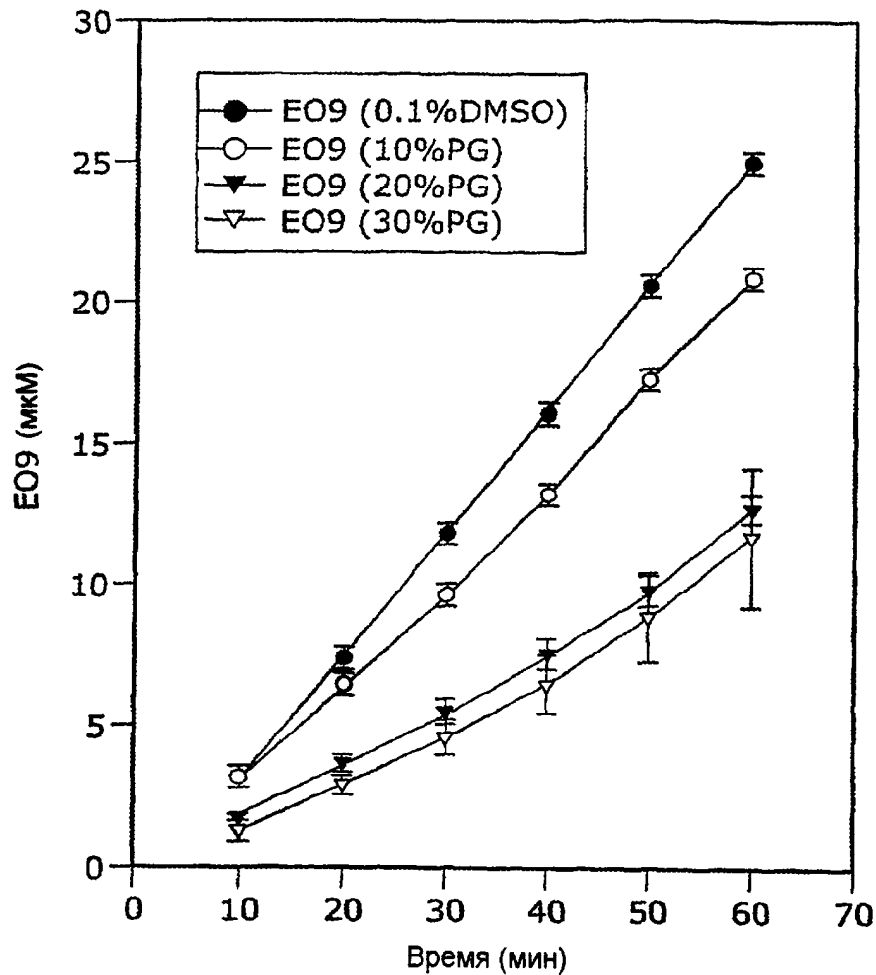
ФИГ.6С



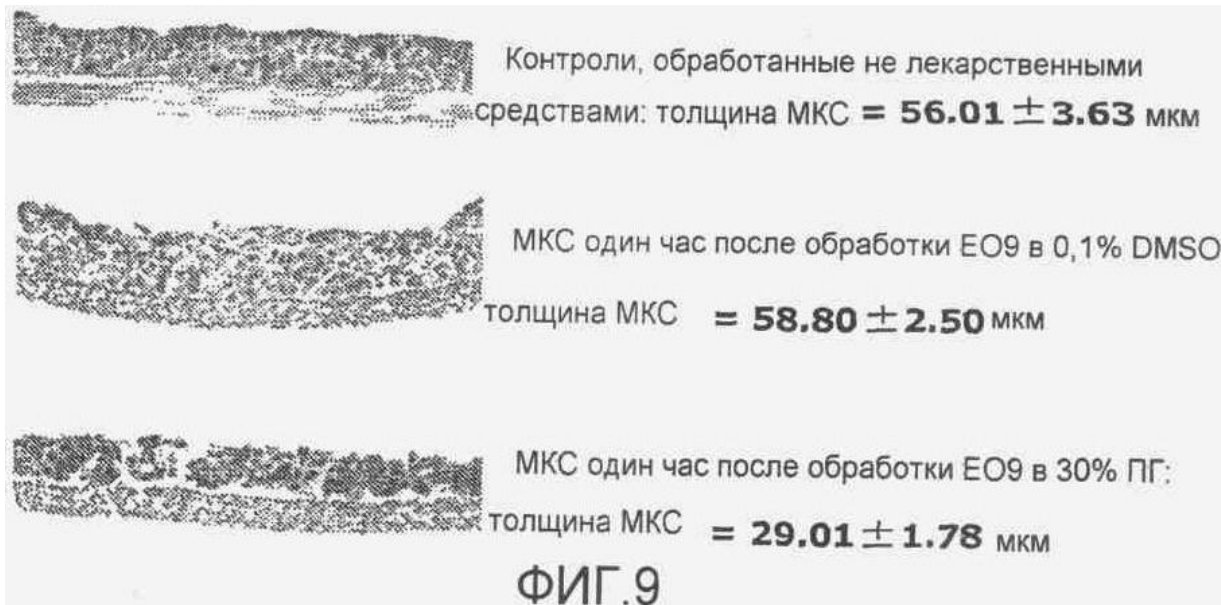
ФИГ.6D



ФИГ.7



ФИГ.8



ФИГ.9