



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **332441**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 31/453 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20034124	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.03.22 PCT/EP2002/04083
(22)	Inng.dag	2003.09.16	(85)	Videreføringsdag	2003.09.16
(24)	Løpedag	2002.03.22	(30)	Prioritet	2001.03.23, US, 277948 2001.07.05, US, 302692 2001.12.04, US, 334916
(41)	Alm.tilgj	2003.09.16			
(45)	Meddelt	2012.09.17			
(73)	Innehaver	Aventis Pharma SA, 20, avenue Raymond Aron, FR-92160 ANTONY, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Marie-Christine Bissery, 5, rue Henri-Poincaré, FR-94400 VITRY-SUR-SEINE, Frankrike			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Sammensetning av Taxotere® og flavopiridol			
(56)	Anførte publikasjoner	Proceedings Of The Annual Meeting Of The American Association for Cancer Research, vol. 41, mars 2000, side 143 WO 9730174 A1 Clinical Cancer Research, vol. 5, no. Supplement, november 1999, side 3754 Clinical Cancer Research, vol. 5, no. 7, juli 1996, side 1876-1883 Cancer Research, vol. 57, 15 august 1997, side 3375-3380			
(57)	Sammendrag				

En farmasøytisk sammensetning som omfatter Taxoll® Taxotere® eller derivater, og en cyclinavhengig kinase er beskrevet, så vel som en administreringsform der taxanet gis i perioder med mellomrom og den cyclinavhengige kinasen gis gjentatte ganger i løpet av den samme syklusen.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører sammensetninger av Taxotere® og flavopiridol som er terapeutisk anvendbare ved behandling av neoplastiske sykdommer.

Taxaner og taxoider utgjør en familie av naturlige forekommende diterpenforbindelser som inkluderer et kraftig anti-tumorlegemiddel, paclitaxel. Paclitaxel (Taxol®), opprin-
5 nnelig isolert fra barken av Stillehavsbarlindtre (*Taxus brevifolia*) har vist seg å være svært effektiv ved adjuvans- og neoadjuvansterapier for pasienter med bryst- og eggstokkreft. Mer nylig er dets halvsyntetiske analog, docetaxel (Taxotere®) også funnet å være effektiv ved brystkreftkjemoterapi, hvilket har utvidet antallet av sykdommer som
10 er følsomme for denne klassen av anti-tumorlegemidler, inkludert lunge- og tykktarmskreft. Både Taxol® (paclitaxel) og Taxotere® (docetaxel) binder seg til tubulin, hemmer mikrotubulus-demontering, og svekker mitose, for derved å blokkere progresjonen gjennom M-fase av celledyklusen og letter apoptose.

15 Til tross for den utvilsomme samlede kliniske suksess med taxoidene, viser noen tumorer resistens i forhold til disse legemidlene. Legemiddelresistensen kan være et iboende trekk ved en tumor, eller kan utvikles i tumoren over tid. Tre hovedmekanismer for legemiddelresistens er rapportert: (i) punktmutasjon av tubulingenet, (ii) seleksjon av tubulinisoformer med lav binding til taxaner, og (iii) ekspresjon av multilegemiddel-
20 resistens (MDR) fenotype mediert av P-glykoprotein (P-gp) utstrømningspumpen som kodes ved *mdr1*-genet. Mekanisme (iii) kan forklare den iboende resistensen mot Taxol® og Taxotere® i tumorer som ofte i seg selv uttrykker P-gp, slik som tykktarm- og nyrekreft.

25 Sammensetninger eller foreninger ifølge oppfinnelsen muliggjør at fenomenet pleiotropisk resistens eller "multilegemiddelresistens" kan unngås eller forsinkes.

Fremstillingen av Taxol®, Taxotere® og deres derivater er gjenstand for for eksempel europeiske patenter EP 0,253,738 og EP 0,253,739 og internasjonal søknad PCT WO
30 92/09,589.

Det er nå funnet at effektiviteten av Taxol®, Taxotere® og deres analoger kan forbedres betraktelig når de administreres i kombinasjon med minst én substans som er terapeutisk anvendbar ved anti-cancerbehandlinger og har en mekanisme som er
35 identisk med eller forskjellig fra disse taxanene.

Blant substanser som kan benyttes i forening eller kombinasjon med Taxol[®], Taxotere[®] eller deres analoger, kan enzymer slik som L-asparaginase og cyclinavhengige kinaser slik som flavopiridol, quercitin og genistein nevnes. Forskjellige midler slik som biologiske responsmodifiserende midler eller vekstfaktorinhibitorer, slik som interferoner eller interleukiner, kan også benyttes.

Siden aktiviteten av produktene avhenger av dosene som benyttes, er det mulig å benytte høye doser og øke aktiviteten mens toksisitetfenomenet reduserer eller deres start forsinkes ved å kombinere vekstfaktorer av den hematopoetiske typen, slik som G-CSF eller GM-CSF eller visse interleukiner med Taxol[®], Taxotere[®], deres analoger eller deres kombinasjoner med andre terapeutisk aktive substanser.

Cyclinavhengige kinaser (CDK) er viktige regulerende midler som kontrollerer tidsstillingen og koordinasjonen av cellyklusen. CDK danner reversible komplekser med deres forpliktete cyclinpartnere for å kontrollere overgang gjennom nøkkelknutepunkter i cellyklusen. For eksempel kontrollerer det aktiverte CDK4-cyclin D1-komplekset progresjon via G1-fasen mens CDK1-cyclin B1-komplekset kontrollerer inngang i mitosefasen av cellyklusen. Endogene cyclinavhengige kinasehemmende proteiner (CDKI) er kjente, som binder seg enten til CDK eller cyclinkomponenten og hemmer kinaseaktiviteten. I mange tumorer slik som melanomer, bukspyttkjertelkreft og kreft i spiserøret, er disse naturlige CDKI enten fraværende eller muterte. Således kan selektive CDK-inhibitorer vise seg å være effektive kjemoterapeutiske midler.

Flavopiridol (*cis*-5,7-dihydroksy-2-(2-klorfenyl)-8-[4-(3-hydroksy-1-metyl)-piperidinyl]-1-benzopyran-4-on) er et syntetisk flavon som har vist seg å ha anti-tumoraktivitet mot forskjellige tumorcellelinjer slik som human lungekarcinom, brystkarcinom, og også hemmer tumorvekst i xenograftmodeller. Det er vist å indusere stans i både G1- og G2-fasen av cellyklusen. Flavopiridol er en kraftig og selektiv inhibitor av CDK, og dets anti-tumoraktivitet er relatert til dets CDK-inhibitoraktivitet. Studier har vist at dets celleveksthemmende aktivitet oppstår på en cellyklus spesifikk måte. Se Bioorg. & Med. Chem. Letters 10: 1037 – 1041 (2000).

Taxotere[®] og flavopiridol har forskjellige mekanismer som kan forbedre effektiviteten for hver især. Den forbedrede effektiviteten av en sammensetning ifølge oppfinnelsen kan demonstreres ved bestemmelsen av den terapeutiske synergien. En sammensetning viser en terapeutisk synergi dersom den er terapeutisk overlegen i forhold til én eller

flere av bestanddelene som benyttes ved dets optimale dose (T.H. Corbett m.fl., Cancer Treatment Reports, 66: 1187 (1982)).

Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research,
 5 vol. 41, mars 2000, s.143 beskriver en kombinasjon av docetaxel og flavopiridol som er
 testet på brystkreftceller, men omfatter ingen in vivo resultater.

WO 97/30174 A; Clinical Cancer Research, vol. 5, nr. Suppl., november 1999, s. 3754;
 Clinical Cancer Research, vol. 5, nr. 7, juli 1996, s. 1876 – 1883; og Cancer Research,
 10 vol. 57, 15. August 1997, s. 3375 – 3380 beskriver en kombinasjon som innbefatter
 flavopiridol og paclitaxel, men ingen kombinasjon som innbefatter flavopiridol og
 docetaxel.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en farmasøytisk sammensetning med
 15 terapeutisk synergi ved behandling av neoplastiske sykdommer som omfatter
 Taxotere® og flavopiridol.

For å demonstrere effektiviteten av en sammensetning, kan det være nødvendig å sam-
 menligne den maksimale tolererte dosen av sammensetningen med den maksimale tole-
 20 rerte dosen av hver av de separate bestanddelene i det aktuelle studiet. Effektiviteten
 kan kvantifiseres, for eksempel med $\log_{10}$ celledød, hvilket bestemmes ifølge den føl-
 gende formelen:

$$\log_{10} \text{ celledød} = T-C \text{ (dager)} / 3,32 \times T_d$$

25

der T-C står for tiden det tar for at cellene skal vokse, hvilket er gjennomsnittstiden i
 dager for tumorene i den behandlede gruppen (T) og tumorene i den behandlede grup-
 pen (C) til å nå en forhåndsbestemt verdi (1 g for eksempel), og T_d står for tidsperioden
 i dager som er nødvendig for at volumet av tumoren skal dobles i kontrolldyrene (T.H.
 30 Corbett m.fl., Cancer, 40, 2660-2680 (1977); F.M. Schabel m.fl., Cancer Drug
 Development, Del B, Methods in Cancer Research, 17, 3-51, New York, Academic
 Press Inc. (1979)). Et produkt vurderes som å være aktivt dersom $\log_{10}$ celledød er
 større eller lik 0,7. Et produkt vurderes som å være svært aktivt, dersom $\log_{10}$ celledød
 er større enn 2,8.

35

Sammensetningen som benyttes ved sin egen maksimale tolererbare dose, der hver av bestanddelene vil være til stede i en dose som generelt ikke går ut over dens maksimale tolererbare dose, vil vise terapeutisk synergi når $\log_{10}$ celledød er større enn verdien av $\log_{10}$ celledød for den beste bestanddelen når den administreres alene.

5

Effektiviteten av kombinasjonene på solide tumorer kan bestemmes eksperimentelt på den følgende måten:

Dyrene som utsettes for eksperimentet, generelt mus, blir subkutan podet bilateralt med
 10 30 – 60 mg av et tumorfragment på dag 0. Dyrene som bærer tumorer blandes før de utsettes for forskjellige behandlinger og kontroller. Ved tilfellet av behandling av frem-skredne tumorer, får tumorene utvikles til den ønskede størrelsen, de med utilstrekkelig utviklede tumorer blir eliminert. De utvalgte dyrene fordeles tilfeldig til å gjennomgå behandlingene og kontrollene. Dyrene som ikke har tumorer kan også utsettes for de
 15 samme behandlingene som dyrene med tumorer for å være i stand til å skille den toksiske effekten fra den spesifikke effekten på tumoren. Kjemoterapi starter generelt fra 3 til 22 dager etter poding, avhengig av tumortypen, og dyrene observeres hver dag. De forskjellige dyregruppene veies 3 eller 4 ganger per uke inntil det maksimale vekttapet er nådd, og gruppene blir deretter veid minst én gang per uke inntil slutten av forsøket.

20

Tumorene måles 2 eller 3 ganger per uke inntil tumoren når tilnærmet 2g, eller frem til dyret dør dersom dette forekommer før tumoren når 2 g. Dyrene obduseres etter avlivning.

25 Anti-tumoraktiviteten bestemmes i henhold til de forskjellige parametrene som er registrert i tabell I og II.

For en studie av sammensetningene på leukemier, podes dyrene med et bestemt antall celler, og anti-tumoraktiviteten bestemmes ved økningen i overlevelsestid for de be-
 30 handlede musene i forhold til kontrollene. Produktet vurderes som å være aktivt dersom økningen i overlevelsestid er større enn 27%, og vurderes som å være svært aktivt dersom det er større enn 75% ved tilfellet av P388-leukemier.

I eksemplene som følger ble mus podet med brystadenokarcinom MA 13/C og behand-
 35 let med sammensetninger av Taxotere[®] og flavopiridol med forskjellige administreringsplaner og forskjellige administreringsruter. Både Taxol og Taxotere, så vel som

flavopiridol kan administreres oralt så vel som intravenøst. Noen av disse planene viser klart terapeutisk synergi.

Ytterligere formål og fordeler ved oppfinnelsen vil delvis fremkomme i beskrivelsen som følger, og delvis være åpenbar fra beskrivelsen, eller kan erfares ved utøvelse av oppfinnelsen. Formålene og fordelene ved oppfinnelsen vil forstås og nås ved hjelp av elementene og sammensetningene som i særdeleshet er utpekt i de vedheftede kravene.

Det skal forstås at både den foregående generelle beskrivelsen og den etterfølgende detaljerte beskrivelsen kun tjener som eksempel og forklaring og er ikke begrensende for oppfinnelsen som er krevet.

Eksempel 1

For å bestemme aktiviteten av hver bestanddel i sammensetningen, ble Taxotere® og flavopiridol gitt alene til MA 13/3-bærende mus. Taxotere® ble administrert intravenøst på dag 15 og 21; dosen ved hver dag var 30 mg/kg for en total dosering på 60 mg/kg. Benyttet alene resulterte denne doseringen i en $\log_{10}$ celledød på 4,7 og en fullstendig respons i alle fem av musene som ble behandlet på denne måten. Administrering av flavopiridol alene på dag 15 og 21 i en dose på 6 mg/kg hver dag, eller en total dosering på 12 mg/kg, resulterte i ingen fullstendige responser i de 5 musene som ble undersøkt.

Forbindelsene ble deretter kombinert på to måter og testet i en periodevis tilbakevendende plan. Ved den første sammensetningen ble flavopiridol gitt først på dag 15 og 20 (total dosering 9 mg/kg) og Taxotere® ble gitt på de påfølgende dagene 16 og 21 (total dosering 45 mg/kg). Når det ble gitt på denne måten, var $\log_{10}$ celledød 5,5 og resulterte i 5 av 5 fullstendige responser i musene som var behandlet. I denne periodevis tilbakevendende planen var $\log_{10}$ celledød bedre enn Taxotere® gitt alene og fremdeles resulterte det i 5 av 5 fullstendige responser på tross av det faktum at 25% mindre Taxotere® og 25% mindre flavopiridol ble administrert i denne sammensetningen enn i kontrollen.

Når bestanddelene i sammensetningen ble vendt om og Taxotere® ble gitt først på dagene 15 og 20 og flavopiridol ble gitt på dagene 16 og 21 i de samme mengdene, var $\log_{10}$ celledød svakt mindre enn Taxotere® alene, men igjen var det 5 av 5 fullstendige responser. Tabell 1 illustrerer disse resultatene og viser at kombinasjonen av flavopiri-

dol og Taxotere[®] administrert i 20% mindre mengder hadde en effektivitet lignende med Taxotere[®] alene.

Tabell I

5 Flavopiridol-Taxotere[®]-sammensetning i MA 13/C-bærende mus : 24 timer adskilt

IV-middel	Plan	HNTD (DT) Mg/kg		% bwl (nadir)	Ick	Kommentarer
		Docetaxel	Flavo			
Taxotere [®]	15,21	30,0 (60,0)	-	8 (27)	4,75	5,5 CR HDE
Flavopiridol	15,21	-	6,0 (12,0)	6 (16)	0,4	0/5 CR
Kombinasjon 24 t adskilt						
Flavo først	15,20	22,5	4,5	7 (22)	5,5	5,5 CR HDE
Taxotere	16,21	(45,0)	(9,0)			
Taxotere		22,5	4,5	7 (25)	4,4	5/5 CR HDE
først		(45,0)	(9,0)			

Td = 2,2 dager; tid for kontroll til å nå 1 g = 20,3 dager; medianbyrde ved start av terapi = 130 – 160 mg

10 CR = fullstendig respons; IV = intravenøs; bwl = kroppsvekttap ved nadir; (DT) = total dose;

HNTD = høyeste ikke-toksiske dose; Ick = log₁₀ celledød

Eksempel 2

15

Dagene hvorved flavopiridol ble administrert ble økt, og det ble funnet at når MA 13/C-bærende mus ble eksponert for lignende doser av flavopiridol litt over 8 dager i en 10-dagers syklus mens Taxotere[®] ble gitt på den første og siste dagen i 10-dagers syklusen, var det en klar synergi.

20

Tabell 2 nedenfor gir den høyeste ikke-toksiske totale dosen av hver komponent alene – 96,8 mg/kg av Taxotere[®] og 23, 2 mg/kg av flavopiridol. Når bestanddelene ble administrert i sammensetning, med Taxotere[®] administrert på dag 14 og 23, og flavopiridol på

dag 14 til 17 og 20 til 23, var tre sammensetninger klart synergistiske og en fjerde var lik med effektiviteten til Taxotere® alene. Alle fire sammensetninger resulterte i seks av seks av fullstendige responser; dvs. 100% fullstendig responser.

- 5 Et 3-arms doseresponsstudium ble utført i C3H/HeN-mus som bærer målbare tumorer ved start av terapi (230 mg). Den utvalgte modellen var en murin brystadenokarcinom MA13/C, valgt på basis av dets kjemosensitivitet i forhold til docetaxel. Mus ble behandlet med Flavo (dvs. én gang per dag, dag 14 til 17, og dag 20 til 23 etter tumor-implantering), eller docetaxel (dvs. på dag 14 og 23), eller deres sammensetning. Resultater: Ved den høyeste ikke-toksiske dose (HNTD, 2,9 mg/kg/dose, total dose av 23,2 mg/kg), Flavo administrert IV som et enkelt middel var inaktivt med en -0,4 log celledød netto (log celledød netto = tumorvekstforsinkelse --behandlingsvarighet / 3,32 x tumordoblingstid), og ingen fullstendig tilbakevending (CR). HNTD av docetaxel alene (48,1 mg/kg/injeksjon, total dose på 96,8 mg/kg) ble funnet å være svært aktiv (3 log celledød netto, 6/6 CR). Klar synergisme ble oppnådd ved den høyeste ikke-toksiske sammenstillingen (Flavo ved 1,93 mg/kg/dose og docetaxel ved 53,2 mg/kg/injeksjon) med en 7,6 log celledød netto og 6/6 CR. Denne sammensetningen ble godt tolerert og induerte 13% kroppsvekttap ved nadir som oppstår 6 dager etter siste behandling. Synergisme ble oppnådd på to ytterligere lavere dosenivåer sammenlignet med docetaxel HNTD.
- 20 Denne synergien ble også observert når Flavo ble administrert oralt.

TABELL II

Flavopiridol – Taxotere®-sammensetning
Brystadenokarcinom MA13/C ”gjentatt eksponering”

25

IV-midler mg/kg/dose (total dose)		% bw1 (nadir)	lck brutto	CR	Kommentarer
Taxotere D14,23	Flavopiridol D14-17, 20-23				
78,1 (156,2)	-	20 (29)	-	-	2/6 DD
48,1 (96,8)	-	8 (28)	4,4	6/6	HNTD
-	4,8 (38,4)	>20	-	-	4/5 DD
-	2,9 (23,2)	3 (18)	1,0	0/6	HNTD
-	1,75 (14)	+ 10 (24)	0,0	0/6	
48,4 (96,8)	2,9 (23,2)	15 (27)	-	-	2/5 DD
53,2 (106,4)	1,93 (15,44)	13 (29)	9,0	6/6	HNTD

43,6 (87,2)	1,6 (12,8)	9 (29)	7,0	6/6	
36,3 (72,6)	1,31 (10,48)	3 (29)	5,1	6/6	
31,5 (63,0)	1,14 (9,12)	6 (28)	4,4	6/6	
24,2 (48,4)	0,88 (7,04)	5 (19)	2,0	2/6	

Td = 2,2 dager. Tid nødvendig for at kontrollen når 1 g = 17,8 dager; mediantumor-
byrde ved start av terapi 210 – 260 mg; CR = fullstendig respons; IV = intravenøs; bwl
= kroppsvekttap ved nadir; (DT) = total dose; HNTD = høyeste ikke-toksiske dose; lck
5 = $\log^{10}$ celledød.

Eksempel 3

Taxotere ble injisert IV på dag 14 og 25 etter tumorimplantering. Flavo ble administrert
10 oralt én gang per dag fra dag 14 til 18 og fra dag 21 til 25.

FLAVOPIRIDOL (po) – DOCETAXEL (iv)

Forlenget eksponering MA 13/C

Middel	Plan	HNTD (DT)		% bwl (nadir)	lck	Kommentarer
		<u>mg/kg</u> TXT	Flavo			
TXT Flavo	14,25 14-18, 21-25	30 (60)	- 2,7 (27)	3,6 (33) 11,6 (26)	0,9 0,1	HNTD HNTD
Sammensetning TXT Sammensetning Flavo	14, 25 14-18, 21-25	45 (90)	4,5 45	9,7 (19)	□ 5	HNTC

15 $\cong$ 320 mg – tumorvekt på dag 14
(BCM-1252) – eksperimentnummer.

Som i eksempel 2 ble sammensetningen av docetaxel og daglig gjentatt Flavo funnet å
være mer aktiv enn begge av de enkelte midlene, ved ekvitoksiske doseringer. Synergi
20 er vist ved log 4-økningen i døde celler.

Andre utførelsesformer ifølge oppfinnelsen vil være åpenbare for en fagmann på området ut ifra betraktninger av beskrivelsen og utøvelsen av oppfinnelsen som her er beskrevet. Det er ment at beskrivelsen og eksemplene kun skal anses som eksempel, og et riktig omfang og tanke ved oppfinnelsen er indikert i de følgende kravene.

P a t e n t k r a v

1.

5 Farmasøytisk sammensetning med terapeutisk synergi ved behandling av neoplastiske sykdommer som omfatter Taxotere[®] og flavopiridol.

2.

10 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, der bestanddelene i sammensetningen administreres separat og spredt ut over tid.

3.

15 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, der den neoplastiske sykdommen er brystkreft.

4.

20 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, der den neoplastiske sykdommen er lungekreft.

5.

20 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, der flavopiridol administreres oralt.