



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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2009107085/14**, **20.07.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.07.2007(30) Конвенционный приоритет:
02.08.2006 US 11/461,961(43) Дата публикации заявки: **10.09.2010**(45) Опубликовано: **27.12.2010 Бюл. № 36**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2004037235 A**, **06.05.2004**. **WO 0067024 A**, **09.11.2000**. **US 6545048 B**, **08.04.2003**. **RAJESHKUMAR N V et al: Endothelin B receptor agonist, IRL 1620, enhances the anti-tumor efficacy of paclitaxel in breast tumor rats, BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, NIJHOFF, BOSTON, vol. 94, №3, 2005 p.237-247.**

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **02.03.2009**(86) Заявка РСТ:
US 2007/074036 (20.07.2007)(87) Публикация РСТ:
WO 2008/016793 (07.02.2008)

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):

**ГУЛАТИ Анил (US),
РЕДДИ Гуру (US),
ЛЕНАЗ Луиджи (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**СПЕКТРУМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US),
ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС (US)**

(54) СПОСОБЫ, КОМПОЗИЦИИ И ИЗДЕЛИЯ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ЛЕЧЕНИЮ РАКА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины и может быть использовано для лечения рака предстательной железы. Осуществляют введение агониста эндотелина В IRL1620 и химиотерапевтического агента. Причем химиотерапевтический агент выбирают из доксорубина и 5-

фторурацила (5-FU). Кроме того, используют изделие, содержащее композицию с активным ингредиентом, которым является агонист эндотелина В IRL1620, а также инструкцию по введению указанной композиции. Заявленная группа изобретений позволяет увеличить кровоснабжение опухоли предстательной железы. 2 н. и 11 з.п.ф-лы, 36 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2009107085/14, 20.07.2007**(24) Effective date for property rights:
20.07.2007(30) Priority:
02.08.2006 US 11/461,961(43) Application published: **10.09.2010**(45) Date of publication: **27.12.2010 Bull. 36**(85) Commencement of national phase: **02.03.2009**(86) PCT application:
US 2007/074036 (20.07.2007)(87) PCT publication:
WO 2008/016793 (07.02.2008)

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):

**GULATI Anil (US),
REDDI Guru (US),
LENAZ Luidzhi (US)**

(73) Proprietor(s):

**SPEKTRUM FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US),
DZE BORD OF TRASTIZ OF DZE
JuNIVERSITI OF ILLINOJS (US)**

(54) METHODS, COMPOSITIONS AND PRODUCTS FOR CANCER TREATMENT

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, and can be used for prostate cancer treatment. B IRL1620 endothelin agonist and a chemotherapeutic agent are introduced. And the chemotherapeutic agent is specified in doxorubicine and 5-fluorouracil (5-FU). Besides, there is used a

product containing a composition with an active ingredient which is B IRL1620 endothelin agonist, and also the introduction instructions of the specified composition are ensured.

EFFECT: group of inventions allows to intensify prostate tumour blood supply.

13 cl, 18 tbl

Ссылки на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент США № 11/461961, поданной 2 августа 2006, которая является частичным продолжением заявки на патент США № 11/360236, поданной 22 февраля 2006 (по которой испрашивается
 5 приоритет по предварительным заявкам на патент США № 60/655656; 60/655654; и 60/655643, поданным 22 февраля 2005), которая является частичным продолжением заявки на патент США № 10/691915, поданной 23 октября 2003, по которой испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 60/420960,
 10 поданной 24 октября 2002. Содержание всех указанных заявок включено в данное описание полностью в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам, композициям и изделиям, способствующим лечению рака, включая солидные опухоли, путем введения агониста эндотелина и химиотерапевтического агента.
 15

Уровень техники

Успешное лечение раковых заболеваний, включая солидные опухоли, остается невыполненной медицинской задачей, несмотря на все большее понимание
 20 молекулярной биологии опухолевых клеток и доступность увеличивающегося числа потенциальных терапевтических агентов. Например, уровень заболевания раком молочной железы существенно вырос за последние 10 лет, при этом рак молочной железы является в США одной из ведущих причин смертности среди женщин в возрасте 40-49 лет.

Одной из проблем в лечении раковых заболеваний является то, что эффективная доза, характерная для широкого спектра потенциальных химиотерапевтических агентов, ограничена неселективностью этих агентов, сильным токсическим воздействием на нормальные ткани. В результате этого многие пациенты страдают от
 30 побочных эффектов, возникающих при химиотерапии, без ощутимых улучшений от лечения. Например, химиотерапевтический агент паклитаксел ингибирует клеточную пролиферацию и индуцирует апоптоз опухолевых клеток. Однако клинической полезности паклитаксела препятствует дозо-ограничивающая токсичность, включая гиперчувствительность, нейтропению и периферийную невропатию. Таким образом,
 35 существует потребность в разработке более специфических и менее токсичных способов лечения рака.

Целевая (направленная) доставка химиотерапевтических агентов в опухоли могла бы иметь преимущество в увеличении пользы от химиотерапевтических агентов, минимизируя при этом их системное токсическое воздействие. Такая целевая доставка
 40 также могла бы снизить необходимые дозы химиотерапевтических агентов, тем самым потенциально уменьшая недопустимые отрицательные воздействия этих агентов. Один из возможных способов достижения целевой доставки химиотерапевтических агентов заключается в использовании отличительных особенностей сосудистой сети
 45 опухоли.

Опухоли, размер которых превышает несколько миллиметров, нуждаются в постоянном снабжении питательными веществами и поэтому развивают свою собственную сосудистую сеть и кровоток. Folkman, Cancer Res, 46:467 (1986). Без
 50 постоянной подпитки из этих развивающихся кровеносных сосудов опухоли оказываются в условиях гипоксии и впоследствии погибают. Развитие новой сосудистой сети из ранее существовавших кровеносных сосудов называется "ангиогенезом".

Во время ангиогенеза кровеносные сосуды опухоли развиваются существенно отличным образом от нормальной сосудистой сети и имеют другие свойства.

Однослойные эпителиальные клетки представляют собой первые, быстро сформированные кровеносные сосуды опухоли. Такие вновь сформированные кровеносные сосуды опухоли лишены слоя гладкой мускулатуры или иннервации. Опухоли также включают зрелые кровеносные сосуды, которые обладают всеми авторегуляторными функциями. Mattsson et al., Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, стр. 129 (1979); Reinhold, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, стр. 115 (1979); Warren, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, стр. 26 (1979).

Сосудистый тонус (степень расширения или сужения кровеносных сосудов) управляется эндогенными факторами хозяина, включая H^+ , K^+ , Ca^{2+} , pO_2 , pCO_2 и окись азота (NO), а также другими регуляторными веществами, такими как эндотелин (ET-1). Secombe et al., Landes, Austin, стр. 40 (1994); Luscher et al., The endothelium: modulator of cardiovascular function, CRC Press, Boca Raton, стр. 61 (1990). ET-1 значительно влияет на регуляцию сосудистого тонуса (Yanagisawa et al., Nature, 332:411 (1988)), и ученые показали увеличение экспрессии ET1 и ET_B рецепторов в солидных опухолях, включая карциному молочной железы. Alanen et al., Histopathology, 36:161 (2000); Nelson et al., Cancer Res, 56:663 (1996); Kar et al., Biochem Biophys Res Commun 216:514 (1995); Pagotto et al., J Clin Invest, 96:2017 (1995); Yamashita et al., Cancer Res, 52:4046 (1992); Yamashita et al., Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 74:363 (1991). Более того, стимуляция рецепторов ET_B приводит к увеличению кровоснабжения опухолей путем расширения кровеносных сосудов опухоли. Настоящее изобретение использует этот факт путем применения агонистов рецепторов ET_B для селективного усиления кровотока в опухоли с целью увеличения целевой доставки химиотерапевтических агентов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к введению агонистов эндотелина и химиотерапевтического агента с тем, чтобы способствовать лечению раковых заболеваний, включая солидные опухоли. В частности, опухоли имеют характерную сосудистую сеть, включающую увеличенное количество рецепторов ET_B, которые при связывании вызывают расширение кровеносных сосудов. Поскольку рецепторы ET_B представляют собой сосудорасширяющие средства, агонист рецепторов ET_B в сочетании с химиотерапевтическим агентом является полезным при лечении солидной опухоли, такой как опухоль, обнаруженная при раке молочной железы. Агонист рецептора ET_B может более эффективно доставлять химиотерапевтические агенты в опухоли, приводя к улучшенному лечению.

Более конкретно, один из вариантов осуществления по настоящему изобретению включает способ, способствующий лечению рака, включающий введение агониста ET_B и химиотерапевтического агента. В различных вариантах осуществления способов по настоящему изобретению агонист ET_B и химиотерапевтический агент могут вводиться по существу одновременно или могут вводиться последовательно (химиотерапевтический агент вводится до агониста ET_B или агонист ET_B вводится до химиотерапевтического агента). В некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению при по существу одновременном введении агониста ET_B и химиотерапевтического агента их можно вводить в виде одной композиции.

Другой вариант осуществления по настоящему изобретению включает композицию, содержащую химиотерапевтический агент, агонист ET_B и необязательный наполнитель. Другой вариант осуществления по настоящему изобретению включает изделие, содержащее композицию, которая содержит агонист ET_B, и инструкцию по

введению композиции с химиотерапевтическим агентом для лечения солидной опухоли. Изделия по настоящему изобретению дополнительно могут содержать один или несколько химиотерапевтических агентов. Если изделия по настоящему изобретению включают один или несколько химиотерапевтических агентов, то агонист ЕТ_В и химиотерапевтический агент могут быть частью одной и той же композиции, могут находиться в виде отдельных композиций, либо могут быть представлены и тем, и другим способом.

Раковые заболевания, которые лечат при помощи способов, композиций или изделий по настоящему изобретению, могут включать солидные опухоли, в том числе, без ограничения, опухоли яичников, опухоли толстой кишки, саркому Капоши, опухоли молочной железы, меланому, опухоли предстательной железы, менингиому, опухоли печени, листовидные опухоли молочной железы и их комбинации.

Агонисты эндотелина В, используемые согласно способам, композициям или изделиям по настоящему изобретению, могут селективно усиливать кровоснабжение солидных опухолей, таким образом, увеличивая доставку химиотерапевтических агентов в солидную опухоль. Агонисты эндотелина В, которые могут использоваться согласно настоящему изобретению, могут включать, без ограничения, один или несколько из: ЕТ-1, ЕТ-2, ЕТ-3, BQ3020, IRL1620 (N-suc-[Glu9,Ala11,15]ЕТ-1(8-21)), сарафотоксин 56с, [Ala1,3,11,15]ЕТ-1 и их комбинации. Химиотерапевтические агенты могут включать, без ограничения, одно или несколько из следующих веществ: адриамицин, камптотецин, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, альфа-интерферон, бета-интерферон, гамма-интерферон, интерлейкин 2, иринотекан, доцетаксел, паклитаксел, топотекан, 5-фторурацил и их комбинации. Конкретные способы, композиции или изделия по настоящему изобретению включают IRL1620, в качестве агониста ЕТ_В, с химиотерапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из: паклитаксела, доксорубицина, 5-фторурацила и их комбинации.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 показано влияние IRL1620 на паклитаксел-индуцированные изменения в перфузии опухоли;

На фиг.2А-2Е показано влияние ЕТ-1 на системную гемодинамику у не имеющих рака крыс и крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.3А-3В показано влияние ЕТ-1 на кровоток и региональное сосудистое сопротивление в ткани молочной железы у не имеющих рака крыс и крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.4А-4С показано влияние ЕТ-1 на перфузию, концентрацию подвижных клеток крови (СМВС) и скорость клеток крови в ткани молочной железы у не имеющих рака крыс и крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.5А-5С показано влияние BQ788 на ЕТ-1-индуцированные изменения в перфузии кровью, СМВС и скорость клеток крови в ткани молочной железы у не имеющих рака крыс и крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.6 показано влияние наполнителя или IRL1620 на фармакокинетику паклитаксела в плазме при анализе у нормальных крыс и крыс с опухолью, как определено при помощи ВЭЖХ;

На фиг.7 и 8 показано влияние наполнителя или IRL1620 на фармакокинетику [³Н] паклитаксела в плазме, как определено при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика;

На фиг.9А и 9В показано влияние IRL1620 на перфузию опухоли молочной железы, как измерено при помощи лазерной доплеровской флоуметрии;

На фиг.10 показано зависящее от времени влияние введения IRL1620 на концентрацию [^3H]паклитаксела в опухоли и основных органах у крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.11 показано выраженное в процентах изменение массы тела у крыс с опухолью молочной железы по сравнению с началом лечения;

На фиг.12 показано влияние введения IRL1620 на объем опухоли у крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.13 показано влияние введения IRL1620 на прогрессирование, стазирования и регресс опухоли у крыс с опухолью молочной железы;

На фиг.14А и 14В показано влияние различных доз [физиологического раствора] или IRL1620 на перфузию опухоли предстательной железы, как измерено при помощи лазерной доплеровской флоуметрии (14А), и выраженное в процентах изменение в перфузии опухоли предстательной железы от начальной точки после введения IRL1620 (14В);

На фиг.15 показано влияние IRL1620 на концентрацию [^{14}C]доксорубина (DOX) в опухоли и других основных органах у крыс с опухолью предстательной железы;

На фиг.16 показана масса тела (16А); объем опухоли (16В); и вес опухоли (16С) у крыс с опухолью предстательной железы после введения IRL1620 и DOX;

На фиг.17 показана масса тела (17А); объем опухоли (17В); и вес опухоли (17С) у крыс с опухолью предстательной железы после введения IRL1620 и 5-фторурацила (5-FU);

На фиг.18А и 18В показано влияние IRL1620 на перфузию опухоли-меланомы, как измерено при помощи лазерной доплеровской флоуметрии (18А), и выраженное в процентах изменение в перфузии опухоли-меланомы от начальной точки после введения IRL1620 (18В);

На фиг.19 показано влияние IRL1620 на концентрацию [^3H]паклитаксела в опухоли и других основных органах у крыс с опухолью-меланомой;

На фиг.20 показано влияние различных концентраций IRL 1620 при облучении и без облучения на объем опухоли в зависимости от времени. Для сравнения также показано влияние физиологического раствора и облучения и отсутствия лечения на объем опухоли.

Подробное описание

I. Определения

Инструкция: Как используется в настоящем описании, термин "инструкция" означает материал, сопровождающий фармацевтический продукт, который предоставляет описание того, каким образом вводить продукт, а также содержит данные по безопасному и эффективному применению, необходимые для того, чтобы врач, фармацевт и пациент могли принять обоснованное решение относительно использования этого продукта. Такая инструкция обычно называется "этикеткой" фармацевтического продукта. Инструкция может иметь разную форму, включая, без ограничения, бумажный вкладыш, CD-ROM или ссылку на вебсайт, содержащий относящуюся к фармацевтическому продукту информацию.

Пролекарство: Как используется в настоящем описании, термин "пролекарство" означает соединения, которые *in vivo* быстро преобразуются в применяемое в изобретении соединение, например, путем гидролиза. Подробное обсуждение пролекарств дано у Higuchi et al., Prodrugs as Novel Deliverz System, vol. 14, of the A.C.S.D. Szmposium Series, и у Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceuticasl Association and Pergamon Press, 1987.

Лечить, лечение или способствующий лечению: Как используется в настоящем описании, термины "лечить", "лечение" и "способствующий лечению" означают профилактику, задержку прогрессирования или роста, сокращение или устранение рака, включая солидную опухоль. Также эти термины включают как медицинское терапевтическое, так и/или профилактическое введение, в зависимости от ситуации.

По существу одновременно: Как используется в настоящем описании, термин "по существу одновременно" означает, что два фармацевтических препарата (т.е., агонист ЕТ_В и химиотерапевтический агент) вводятся в одно и то же время. Согласно этому определению, "одно и то же время" следует понимать как точно одновременно, так и в течение примерно десяти минут.

Большинство химиотерапевтических агентов обладают цитостатическими свойствами, нацеленными на разрушение раковых клеток, но при этом причиняющими значимый ущерб физиологически нормальным системам тела. Следовательно, большое преимущество имела бы селективная доставка химиотерапевтических агентов в солидные опухоли, таким образом, помогая избежать таких отрицательных эффектов при лечении рака.

Ангиоархитектура кровеносных сосудов опухоли отличается от ангиоархитектуры нормальных кровеносных сосудов. Carmeliet & Jain, *Nature*, 407:249 (2000). Поэтому сосудистая реактивность опухолей отличается от сосудистой реактивности нормальной ткани. Например, введение доноров окиси азота, агонистов никотинамида и брадикинина модулирует кровоток в опухолях. Jordan et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48:565 (2000); Fukumura et al., *Am J Pathol*, 150:713 (1997); Hirst et al., *Br J Radiol*, 67: 795 (1994).

Эндотелин представляет собой вазоактивное вещество, которое модулирует кровоток и по сравнению с нормальной тканью молочной железы присутствует в больших концентрациях в тканях карциномы молочной железы (по существу, эндотелин может присутствовать в тканях карциномы молочной железы в количестве, равном примерно 12 пг/мг, по сравнению с количеством, равным примерно 0,12 пг/мг в нормальной ткани молочной железы). Kojima et al., *Surg Oncol*, 4 (6): 309 (1995); Kurbel et al., *Med Hypothesis*, 52 (4): 329 (1999); Patel et al., *Mol Cell Endocrinol*, 126 (2): 143 (1997); Yamashita et al., *Cancer Res*, 52 (14): 4046 (1992); Yamashita et al., *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 74 (3): 363 (1991). Эндотелины представляют собой семейство циклических пептидов, имеющих 21 аминокислоту, содержащее у млекопитающих три изоформы ЕТ-1, ЕТ-2 и ЕТ-3. Inoue et al., *Proc Natl Acad Sci США* 86:2863 (1989); Yanagisawa et al., *Nature*, 332:411 (1988). Эндотелины оказывают воздействие, связываясь с двумя разными рецепторами клеточной поверхности ЕТ_А и ЕТ_В. Рецептор ЕТ_В связывает три изотипа пептида с одинаковой афинностью. Рецептор ЕТ_А, напротив, связывает ЕТ-1 с более высокой афинностью, чем другие изоформы. Оба рецептора принадлежат к системе G-белок-связанных рецепторов и опосредуют биологические ответы от множества стимулов, включая факторы роста, вазоактивные полипептиды, нейромедиаторы и гормоны. Masaki, *J Cardiovasc Pharmacol*, 35:S3 (2000); Gulati, Preface. *Adv Drug Deliv Rev*, 40:129 (2000); Gulati et al., *Am J Physiol*, 273:H827 (1997); Levin, *N Engl J Med*, 333:356 (1995). Нецепторы ЕТ_В, на которые направлено настоящее изобретение, находятся как на эндотелиальных клетках (EC), так и на сосудах гладкомышечных клетках (VSMC), и по сравнению с нормальной тканью молочной железы их количество в ткани рака молочной железы увеличено (включая ткань инвазивной, а также дуктальной и лобулярной карциномы молочной железы у людей). Wulfig et al., *Oncol Rep*, 11:791 (2004); Wulfig et al., *Clin Cancer Res*, 9:4125

(2003); Alanen et al., *Histopathology*, 36 (2): 161 (2000). Эндотелин действует на рецепторы ET_B, вызывая расширение сосудов и усиление кровотока в тканях опухоли молочной железы. ET_B рецепторы, преобладающие на EC, вызывают расширение сосудов путем освобождения факторов, таких как простагландин и окись азота. de Nucci et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:9797 (1988). Поскольку ET-1 усиливает кровоток в опухолях путем стимуляции рецепторов ET_B, для селективного усиления кровоснабжения опухолей может использоваться агонист рецепторов ET_B, таким образом, увеличивая целевую доставку и приводя к эффективности химиотерапевтических агентов.

Показано, что рецепторы ET_B присутствуют, например, без ограничения, в раке яичников, миофибробластах, опухоли саркомы Капоши и внутриопухолевых сосудах, раке молочной железы и меланоме. Bagnato et al., *Am J Pathol*, 158:841 (2001); Alanen et al., *Histopathology*, 36 (2):161 (2000); Bagnato et al., *Cancer Res*, 59:720 (1999); Kikuchi et al., *Biochem Biophys Res Comm*, 219:734 (1996). Следовательно, введение агониста рецепторов ET_B в комбинации с химиотерапевтическим агентом можно использовать с тем, чтобы способствовать лечению солидных опухолей, включая, без ограничения, рак предстательной железы, карциному толстой кишки, саркому Капоши, рак молочной железы и меланому.

Агонисты ET_B, используемые по настоящему изобретению, включают, без ограничения, ET-1, ET-2, ET-3, BQ3020, IRL1620 (N-suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]ET-1(8-21)), сарафотоксин 56с, [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 и их комбинации. [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 представляет собой линейный аналог ET-1, в котором дисульфидные мостики удалены заменой Ala на остатки Cys. Saeki et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 179:286 (1991). BQ3020 и IRL1620 представляют собой усеченные линейные синтетические аналоги ET-1 и являются наиболее широко используемыми селективными синтетическими агонистами. IRL1620 представляет собой линейный ET-аналог, в основе структуры которого лежит карбокси-терминальный конец ET-1, и обладает в 120000 раз более сильной селективностью к рецепторам ET_B. Okada & Nishikibe, *Cardiovasc Rev*, 20:53 (2002); Дуглас et al., *Br J Pharmacol*, 114:1529 (1995). IRL1620 является в высокой степени селективным и сильнодействующим агонистом ET_B, при этом отмечается, что он имеет более предпочтительную селективность к подтипу рецепторов ET_{B1}, чем к подтипу ET_{B2}. Brooks et al., *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suppl 3:S322 (1995).

Химиотерапевтические агенты, используемые по настоящему изобретению, включают, например, без ограничения, алкилирующие агенты, антиметаболиты, гормоны и их антагонисты, радиоизотопы, антитела, а также натуральные продукты и их комбинации. Например, агонист ET_B можно вводить с антибиотиками, такими как доксорубицин и другими аналогами антрациклина, азотными аналогами горчичного газа, такими как, без ограничения, циклофосфамид, аналогами пиримидина такими как, без ограничения, 5-фторурацил, цисплатин, гидроксимочевина и ее природные и синтетические производные и т.п. В качестве другого примера, в случае смешанных опухолей, таких как аденокарцинома молочной железы, где опухоли включают гонадотропин-зависимые и гонадотропин-независимые клетки, агонисты ET_B можно вводить совместно, без ограничения, с леупролидом или гозерелином (синтетические пептидные аналоги LH-RH). Дополнительные неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов, которые могут использоваться с настоящим изобретением, включают адриамицин, камптотecin, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, интерферон (альфа, бета, и/или гамма), интерлейкин 2,

иринотекан, доцетаксел, паклитаксел, топотекан и их терапевтически эффективные аналоги и производные.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения для того, чтобы способствовать лечению солидной опухоли, агонист эндотелина используется совместно с химиотерапевтическим агентом. В этом способе агонист эндотелина, в особенности агонист ET_B, увеличивает кровоток в опухоли, которая богата ET_B рецепторами. Следовательно, агонист ET_B обеспечивает более селективную мишень для химиотерапевтического агента и улучшает химиотерапевтический эффект этого агента.

Теоретически предполагается, хотя и не лежит в основе данного описания, что агонисты эндотелина стимулируют рецепторы ET_B, расширяя кровеносные сосуды опухоли, увеличивая таким образом кровоток и суммарную доставку химиотерапевтических агентов в опухоль. Усиленная перфузия опухолей кровью, вызванная агонистами эндотелина, также улучшает оксигенацию (насыщение кислородом) ткани. Улучшенная оксигенация может усиливать терапевтическое действие химиотерапевтических агентов. Эндотелин также может обладать митогенными свойствами. Митогенное действие эндотелина может способствовать усилению действия химиотерапевтических агентов при их совместном введении. Митогенное действие агониста эндотелина может усиливать действие химиотерапевтических агентов, улучшая их проникновение в делящиеся клетки, таким образом, увеличивая их эффективность.

При лечении рака химиотерапия часто указывается в качестве вспомогательного средства при хирургическом лечении. Цель химиотерапии как вспомогательного средства заключается в уменьшении риска повторения и увеличении продолжительности жизни без болезни, когда первичная опухоль подавлена. Химиотерапия используется в качестве вспомогательного средства для лечения рака зачастую в тех случаях, когда болезнь находится на стадии метастазов. Следовательно, агонист ET_B, в частности, полезен до хирургического вмешательства или после него при лечении солидной опухоли в комбинации с химиотерапией.

Модель опухоли молочной железы

Пример 1. Влияние IRL1620 и паклитаксела на перфузию опухоли молочной железы

Приведенные ниже исследования проводились с целью изучения влияния ET-1 на системную гемодинамику и региональную схему у не имеющих рака крыс и крыс с опухолью молочной железы.

Одна из широко изучаемых моделей опухоли молочной железы представляет собой модель химически-индуцированного карциногенеза молочной железы у крыс. van Zwieten, The rat as animal model in breast cancer research. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, стр. 206 (1984); Dao et al., J Natl Cancer Inst, 71:201 (1983); Russo et al., J Natl Cancer Inst, 61:1439 (1978); Huggins et al., Science, 137 (1962); Huggins et al., Proc Natl Acad Sci USA, 45: 1294 (1959). Химически-индуцированный онкогенез молочной железы у крыс представляет собой модель, очень похожую на рак человека. Russo et al., Lab Invest, 62: 244 (1990). В терминах структуры ткани молочная железа крысы сравнима с молочной железой женщины. Она сформирована эпителием, который покрывает трубочки и альвеолы, и стромой, соединительной тканью, поддерживающей этот орган. Эти две составляющие находятся в непрерывном взаимодействии во время эмбрионального развития и в период взрослой жизни. По этой причине в ниже описанных исследованиях в качестве модели была выбрана данная аутохтонная

экспериментальная модель, поскольку она имеет наиболее сильное сходство с раком человека. *Id.*

Химически-индуцированный карциногенез молочной железы у крыс обычно получают путем введения 7,12-диметилбенз(а)антрацена (DMBA) или N-метилнитрозомочевины (MNU). Rogers et al., Chemically induced mammary gland tumor in rats: modulation by dietary fat. Alan R. Liss, Inc, New York 255 (1996). Опухоли, индуцированные DMBA или MNU, обладают различными морфологическими характеристиками. В частности, опухоли, индуцированные MNU, больше локализованы в молочной железе и менее вероятно подвержены метастазам. Macejova et al., Endocr Regul, 35:53 (2001). Поэтому MNU часто выбирают в качестве химического агента для специфической индукции опухолей молочной железы у крыс. Такие опухоли молочной железы могут быть доброкачественными с фиброаденомами и папилломами, или они могут быть злокачественными. van Zwieten, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, стр. 206 (1984). Крысы имеют шесть пар молочных желез, одна пара находится в цервикальной области, две расположены в грудной области, одна - в брюшной области, и две - в паховой области. *Id.*; Astwood et al., Am J Anat, 61 (1937). У девственных крыс, обработанных MNU, в грудной области развивается большее количество опухолей, чем в брюшной. Russo et al., Lab Invest, 57:112 (1987).

Использовали самок крыс Sprague Dawley (Harlan Co., Madison, Wis.) весом 180-200 граммов (г). Все животные содержались по три в клетке в условиях контролируемой комнатной температуры ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), влажности ($50 \pm 10\%$) и искусственного освещения (0600-1800 часов). Животным давали пищу и воду *ad libitum*. Эксперименты проводили после прохождения животными акклиматизации к окружающей среде в течение, по меньшей мере, четырех дней.

N-метилнитрозомочевина (MNU) была приобретена в компании Ash Stevens Inc. (Detroit, Michigan). IRL1620 и эндотелин-1 (ET-1) были приобретены в компании American Peptide Company Inc. (Sunnyvale, Calif). ET-1 растворяли в 0,1% альбумине.

MNU (50 мг/кг) или физиологический раствор (1 мл/кг) вводили самкам крыс Sprague Dawley внутрибрюшинно (i.p.). После достижения опухолями размера в диаметре примерно 2-4 см проводили эксперименты по изучению кровотока.

Во время экспериментов по изучению кровотока крыс анестезировали уретаном (1,5 г/кг, внутрибрюшинно). (Sigma Chemicals, St.Louis, Mo.), и в левую бедренную вену вводили канюлю (трубку PE 50, Clay Adams, Parsipanny, N.J) для введения лекарственного вещества.

Животные были поделены на следующие группы:

Группа I: нормальные крысы, обработанные физиологическим раствором + паклитаксел (таксол; 3 мг/кг; через 15 минут после введения физиологического раствора) (N=4);

Группа II: нормальные крысы, обработанные IRL1620 (3 нмоль/кг) + паклитаксел (3 мг/кг; через 15 минут после введения IRL1620) (N=4);

Группа III: крысы с опухолью, обработанные физиологическим раствором + паклитаксел (3 мг/кг; через 15 минут после введения физиологического раствора) (N=4); и

Группа IV: крысы с опухолью, обработанные IRL1620 (3 нмоль/кг) + паклитаксел (3 мг/кг; через 15 минут после введения IRL1620) (N=4).

Перфузию молочной железы крыс кровью измеряли при помощи лазерной доплеровской флоуметрии. См. Song et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys, 18:903 (1990); Song

et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys, 17:1041 (1989). В этой процедуре животным выбривали участок вокруг сосков и вырезали кожу, окружающую молочные железы.

Оптоволоконный зонд стандартной модели прикрепляли к артерии молочной железы и соединяли с лазерным доплеровским флоуметром Periflux PF2b 4000 (Perimed KB, Stockholm, Sweden). Постоянную времени устанавливали на 1,5 секунды, а полосу пропускания устанавливали на 4 КГц. Данные анализировали при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим выполнением теста Дункана. Значимым считался уровень $p < 0,05$.

В кровотоке в ткани молочной железы нормальных крыс не наблюдалось никаких изменений после введения физиологического раствора или IRL1620 и паклитаксела. Значительное отличие от начальной точки наблюдалось в кровотоке в ткани опухоли после инъекции IRL1620 (36,3%, $p < 0,05$) и после введения паклитаксела с последующим введением IRL1620 (51,9%, $p < 0,05$) (см. фиг.1). Таким образом, этот эксперимент показал, что IRL1620 может обеспечивать важный адьювант для лечения рака, включающего введение химиотерапевтических агентов.

Пример 2. Влияние инфузии ЕТ-1 на системную гемодинамику и кровотоков в ткани молочной железы у нормальных крыс и крыс с опухолью

Обработку MNU и физиологическим раствором проводили в виде внутрибрюшинных инъекций за три месяца до проведения исследования. Крыс регулярно пальпировали, начиная с четвертой недели после обработки. Эксперименты проводили после того, как опухоли достигали в диаметре примерно 4-8 мм.

Крыс анестезировали уретаном (1,5 г/кг, внутрибрюшинно). (Sigma Chemicals, St.Louis, Mo.). Все оперируемые области выбривали и протирали смоченным спиртом тампоном. В левую бедренную вену вводили канюлю (трубку PE 50, Clay Adams, Parsipanny, N.J) для введения лекарственного вещества. В левую бедренную артерию вводили канюлю (трубку PE 50) и использовали для взятия контрольного образца крови при помощи отсасывателя (модель 22, Harvard Apparatus, South Natick, Mass.) при изучении микросфер. В правую бедренную артерию вводили канюлю (трубку PE 50) и соединяли с датчиком давления Gould P23 ID для записи кровяного давления на полиграфе Grass P7D (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., USA) через предусилитель 7PI. Частоту сердечных сокращений (HR) регистрировали при помощи тахографа 7P4B Grass (Grass Instrument Co., Quincy, Mass.), запускаемого сигналами кровяного давления. Обнажали правую сонную артерию и в левый желудочек выводили трубку PE 50 через общую сонную артерию. Наличие канюли в левом желудочке подтверждали регистрацией давления на тахографе Grass, используя датчик давления Statham P23 DC (Grass Instrument Co., Quincy, Mass.). При достижении канюлей левого желудочка диастолическое давление падало до нуля. Для того чтобы поддерживать pO_2 , pCO_2 , и pH фактор крови на постоянном уровне и избежать влияния респирации на кровяное давление и HR, животных держали на искусственном дыхании с постоянной скоростью путем введения эндотрахеальной трубки, соединенной с вентилятором для грызунов (Модель 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, Mass.).

На начальной стадии исследования крысы были поделены на две группы, каждая из которых была обработана следующим образом:

Группа I: 30-минутная инфузия ЕТ-1 (50 нг/кг/мин) крысам, обработанным физиологическим раствором (нормальные крысы) (N=6); и

Группа II: 30-минутная инфузия ЕТ-1 (50 нг/кг/мин) крысам, обработанным MNU (50 мг/кг, внутрибрюшинно; крысы с опухолью) (N=6).

Параметры системной гемодинамики и региональной циркуляции определяли в начальной точке, через 30, 60, и 120 минут после начала инфузии ЕТ-1 (50 нг/кг/мин). Поскольку инфузию ЕТ-1 проводили в течение 30 минут, 30-минутные данные показывают влияние ЕТ-1, а 60- и 120-минутные данные указывают на продолжительность влияния ЕТ-1.

Системную гемодинамику и региональное кровообращение определяли, используя процедуру, описанную в литературе. См. Gulati et al., J Lab Clin Med, 126:559 (1995); Gulati et al., Life Sci., 55:827 (1994); Sharma et al., Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 22:593 (1994). При каждом измерении тщательно перемешанную суспензию, содержащую в 0,2 мл физиологического раствора примерно 100000 микросфер (с диаметром 15 ± 1 мкм), меченных ^{46}Sc (скандием), ^{113}Sn (оловом), ^{141}Ce (церием) или ^{95}Nb (ниобием) (New England Nuclear Corporation, Boston, Mass., USA), вводили в левый желудочек и в течение 15 секунд промывали струей 0,3 мл физиологического раствора. Для вычисления кровотока артериальную кровь отбирали со скоростью 0,5 мл/мин через правую бедренную артерию. Кровь отбирали в течение 90 сек, начиная примерно за 5-10 сек до инъекции микросфер.

Перфузию молочной железы крыс кровью измеряли при помощи лазерной доплеровской флоуметрии. См. Song et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys, 18:903 (1990); Song et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys, 17:1041 (1989). У животных выбривали участки вокруг сосков. Вырезали кожу, окружающую молочные железы в виде куска примерно 6 см в ширину и примерно 4 см в длину. К поверхности этого куска прикладывали оптоволоконный зонд стандартной модели и прикрепляли к ткани при помощи двусторонней клейкой ленты. Кусок помещали на металлический держатель и закрепляли лентой с тем, чтобы предотвратить его перемещение, затем соединяли с лазерным доплеровским флоуметром Periflux PF2b 4000 (Perimed KB, Stockholm, Sweden). Постоянную времени устанавливали на 1,5 сек, а полосу пропускания устанавливали на 4 КГц. Данные анализировали при помощи дисперсионного анализа с последующим применением теста Дункана. Значимым считался уровень $p < 0,05$.

В конце эксперимента животных умерщвляли передозировкой пентобарбитала натрия. Все ткани и органы вырезали, взвешивали и помещали в пробирки.

Радиоактивность в стандартах, образцах крови и образцах ткани подсчитывали в гамма-счетчике 5000 серии Packard Minaxi Auto-Gamma (Packard Instruments Co., Downers Grove, Ill.) с заданными окнами, соответствующими энергиям изотопов. Вычисляли следующие параметры: (1) сердечный выброс (CO) ((инъецированная радиоактивность $\times$ скорость забора артериальной крови)/радиоактивность артериальной крови в образце), (2) систолический объем (SV) (CO/HR), (3) общее периферическое сопротивление (TPR) (среднее артериальное давление (MAP)/CO), (4) региональный кровоток ((радиоактивность в ткани $\times$ скорость отбора артериальной крови)/радиоактивность артериальной крови в образце), и (5) региональное сосудистое сопротивление (MAP/региональный кровоток). Данные вычисляли, используя компьютерные программы, описанные в литературе. Saxena et al., Comput Programs Biomed, 12:63 (1980).

У нормальных (обработанных физиологическим раствором) крыс системные гемодинамические параметры в начальной точке были следующими: MAP: $111,1 \pm 4,8$ мм рт.ст.; CO: $268,6 \pm 17,6$ мл/мин; SV: $0,87 \pm 0,06$ мл; TPR: $419,6 \pm 24,37$ мм рт.ст.мин/мл; и HR: $312,5 \pm 20,2$ уд./мин. У нормальных крыс через 30 мин после инфузии ЕТ-1 наблюдали значительное увеличение MAP (14,5%; $p < 0,05$), которое снизилось через 120 минут (17,8%; $p < 0,05$). TPR увеличилось через 120 минут (49,2%; $p < 0,05$). CO снижался

через 60 и 120 минут после инфузии ЕТ-1 (22,9% и 42,5%, соответственно; $p<0,05$). SV снижался через 60 и 120 минут (20,9% и 36%, соответственно; $p<0,05$). Для HR не наблюдалось никаких значимых изменений (фиг.2А-2Е).

5 Системные гемодинамические параметры в начальной точке у крыс с опухолью (обработанных МНУ) были аналогичны параметрам нормальных крыс. У крыс с опухолью наблюдалось значительное увеличение МАР через 30 минут (19,1%; $p<0,05$) и через 60 минут (15,3%; $p<0,05$) после инфузии ЕТ-1. ТРР увеличился через 30 минут (73,9%; $p<0,05$), 60 минут (39,7%; $p<0,05$) и 120 минут (71,4%; $p<0,05$) после введения ЕТ-1. СО снижался через 30, 60 и 120 минут (29,4%, 16,7% и 36,1%, соответственно; $p<0,05$). SV значительно уменьшался через 30, 60 и 120 минут (31,1%, 17,9% и 32,1% соответственно; $p<0,05$). Для HR не наблюдалось никаких изменений (фиг.2А-2Е).

15 После введения ЕТ-1 у нормальных крыс, обработанных физиологическим раствором, не наблюдалось никаких существенных изменений в кровотоке ткани молочной железы или изменений в сосудистом сопротивлении. У крыс с опухолью (обработанных МНУ) наблюдали значимые изменения в кровотоке и региональном сосудистом сопротивлении в ткани молочной железы по сравнению с нормальными (обработанными физиологическим раствором) крысами. Значительное увеличение (153%; $p<0,05$) кровотока в ткани молочной железы у крыс с опухолью наблюдали через 60 минут после введения ЕТ-1 по сравнению с нормальными крысами. Сосудистое сопротивление у крыс с опухолью значительно отличалось в начальной точке (102%; $p<0,05$) и через 60 минут (147%; $p<0,05$) после введения ЕТ-1 по сравнению с нормальными крысами (фиг.3А-3В).

На фиг.4А-4С показаны изменения в перфузии, концентрации подвижных клеток крови (СМВС) и скорости эритроцитов (RBC) в ткани молочной железы у крыс с опухолью и у нормальных крыс. Перфузия ткани молочной железы нормальных крыс кровью после введения ЕТ-1 значительно не изменилась. Перфузия ткани молочной железы крыс с опухолью значительно увеличилась через 30 мин после введения ЕТ-1 (176%; $p<0,05$) по сравнению с нормальными крысами. У крыс с опухолью такое увеличение перфузии вернулось к начальной точке через 60 и 120 минут после введения ЕТ-1.

35 СМВС у крыс с опухолью значительно увеличилась (54%; $p<0,05$) через 60 мин после введения ЕТ-1 по сравнению с нормальными крысами. СМВС вернулась к начальной точке через 120 минут после введения ЕТ-1. Скорость RBC значительно увеличилась (252%; $p<0,05$) через 30 минут после введения ЕТ-1 по сравнению с нормальными крысами. У крыс с опухолью скорость RBC вернулась к начальной точке через два часа (120 мин) после введения ЕТ-1 (фиг.4А-4С).

45 Влияние рецепторов ЕТ_В на изменения, индуцированные инфузией ЕТ-1, в системной гемодинамике и кровотоке ткани молочной железы у нормальных крыс и крыс с опухолью оценивали при помощи другого эксперимента. ВQ788 (т.е., N-цис-2,6-диметилпиперидинокарбонил-L-гамма-метиллейцил-D-1-метоксикарбонилтриптофанил-D-Nle) представляет собой специфический антагонист рецепторов ЕТ_В, который ингибирует связывание рецепторов ЕТ_В со значением IC₅₀, равным 1,2 нм. Поэтому ВQ788 использовался для определения роли ЕТ_В рецепторов в ЕТ-1-индуцированной вазодилатации в опухоли молочной железы. В этом эксперименте исследование проводилось при помощи способов, описанных в предыдущем исследовании за исключением того, что животные были разделены на следующие группы:

Группа I: 20-минутная инфузия BQ788 (American Peptide Company Inc (Sunnyvale, Calif), растворенного в физиологическом растворе с концентрацией 0,5 пмоль/кг, с последующей 30-минутной инфузией ET-1 (50 нг/кг/мин) нормальным крысам, обработанным физиологическим раствором (N=5); и

Группа II: 20-минутная инфузия BQ788 (0,5 пмоль/кг) с последующей 30-минутной инфузией ET-1 (50 нг/кг/мин) крысам с опухолью, обработанным MNU (50 мг/кг, внутривенно) (N=5).

На фиг.5А-5С показано влияние BQ788 на ET-1-индуцированные изменения в перфузии кровью, СМВС и скорости RBC у крыс с опухолью и нормальных крыс, соответственно. Перфузия ткани молочной железы нормальных крыс кровью значительно не изменилась после введения BQ788 или инфузии ET-1. Однако перфузия ткани молочной железы крыс с опухолью значительно уменьшилась через 30 (25,25±5,7%; $p<0,05$) и 60 минут (25,17±2,8%; $p<0,05$) после инфузии ET-1 у крыс, обработанных BQ788. Предварительная обработка BQ788 снизила увеличение в ET-1-индуцированной перфузии у крыс с опухолью. Не наблюдалось никакого различия в перфузии ткани молочной железы у крыс с опухолью и у нормальных крыс после введения ET-1 крысам, обработанным BQ788. Этот результат позволяет предположить, что ET-1-индуцированный вазодилаторный ответ опосредован ET_B рецепторами.

СМВС в начальной точке у крыс с опухолью значительно превышала СМВС в начальной точке в ткани молочной железы у нормальных крыс (42,4%; $p<0,05$). Однако после инфузии BQ788 не наблюдалось никакого различия между СМВС у крыс с опухолью и нормальных крыс. Кроме того, между этими двумя группами не наблюдалось никаких различий в скорости RBC (фиг.5А-5С).

Вышеупомянутые тесты показывают влияние ET-1 на системную гемодинамику и кровоток в ткани молочной железы у крыс с опухолью, обработанных физиологическим раствором и обработанных MNU. Известно, что ET-1 стимулирует ангиогенез, вызывая продуцирование VEGF. Исследования показали, что ET-1 увеличен во многих раковых тканях, таких как карцинома молочной железы (Yamashita et al., Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 74:363 (1991)), листовидная опухоль молочной железы (Yamashita et al., Cancer Res, 52:4046 (1992)), карцинома предстательной железы (Nelson et al., Cancer Res, 56:663 (1996)), карцинома печени (Kar et al., Biochem Biophys Res Commun 216:514 (1995)) и некоторые менингиомы (Pagotto et al., J Clin Invest, 96:2017 (1995)). Вышеупомянутые тесты демонстрируют изменения в ET-1-индуцированных сосудистых ответах в опухоли молочной железы. Способ, использованный в этих тестах, представляет собой хорошо известную технологию использования радиоактивных микросфер для изучения системной гемодинамики и регионального кровообращения. Gulati et al., Am J Physiol, 273:H827 (1997); Gulati et al., Crit Care Med, 24:137 (1996); Gulati et al., J Lab Clin Med, 126:559 (1995); Gulati et al., Life Sci, 55:827 (1994).

Пример 3. Влияние IRL1620 на фармакинетику паклитаксела

Изменение динамики кровотока в организме может значительно влиять на фармакинетику терапевтической составляющей, и известно, что паклитаксел обладает сложными фармакокинетическими свойствами. См., например, Sparreboom et al., Cancer Res 56:2112 (1996a); Gianni et al., J Natl Cancer Inst 87:1169 (1995b); Sonnichsen & Relling, Clin Pharmacokinet 27:256 (1994); Huizing et al., J Clin Oncol 11:2127 (1993); Brown et al., J Clin Oncol 9: 1261 (1991); Longnecker et al., Cancer Treat Rep 71:53 (1987); Wiemik et al., Cancer Res 47:2486 (1987b). Поэтому важно понять влияние IRL1620 на фармакинетику

паклитаксела в плазме. Поэтому представленное в настоящем описании исследование проводилось с тем, чтобы определить, изменяет ли IRL1620, селективный агонист рецепторов ET_B, фармакинетику паклитаксела у крыс, имеющих опухоль молочной железы.

Для исследования использовали 48-дневных (120-140 г) девственных самок крыс Sprague Dawley (Harlan Co., Madison, WI). После получения все животные содержались по три в клетке в условиях контролируемой комнатной температуры (23±1°C), влажности (50±10%) и искусственного освещения (0600-1800 часов).

Животным давали пищу и воду *ad libitum*. Эксперименты проводились только после прохождения животными акклиматизации к окружающей среде в течение, по меньшей мере, четырех дней.

IRL1620 был приобретен в Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). Паклитаксел (6 мг/мл раствор) был приобретен в Ben Venue Laboratories Inc (Bedford OH). Кетамин и ксилазин были приобретены в Phoenix Scientific, Inc. (St. Joseph, MO). [³H]паклитаксел (ImCi, 6,4 Ci/ммоль, специфической активности) был приобретен в Moravek Biochemicals (Moravek Biochemicals, CA). Уретан был приобретен в Sigma Aldrich (Sigma Chemicals, St. Louis, MO).

N-метил-н-нитрозомочевину (MNU) вводили внутрибрюшинной дозой 50 мг/кг, и крыс пальпировали два раза в неделю. Фармакинетические исследования проводили после достижения опухоли 75-100 мм³.

ВЭЖХ-УФ исследования. Крыс анестезировали одной внутрибрюшинной инъекцией уретана (1,5 мг/кг) (Sigma Chemicals, St.Louis, MO). Правую бедренную область выбривали и протирали хирургическим дезинфицирующим средством и спиртом. Правую бедренную артерию и вену обнажали и канюлировали путем введения стерильной трубки PE-50. Шею выбривали и протирали хирургическим дезинфицирующим средством и спиртом. В области шеи делали срединный надрез и в трахею вводили трубку, которую соединяли с вентилятором для грызунов (модель 683, Harvard Apparatus Inc, South Natick, MA). Все хирургические операции выполняли в стерильных условиях. Чтобы предотвратить инфицирование раны наносили мазь, содержащую антибиотик неоспорин (Pfizer, Моррис Plains, NJ). Перед введением лекарственного вещества предоставляли 45-минутный восстановительный период.

Использовали нормальных (обработанных физиологическим раствором) крыс и крыс с опухолью (обработанных MNU). Паклитаксел вводили i.v. (3 мг/кг) через 15 минут после введения IRL1620 (3 нмоль/кг) или наполнителя (физиологический раствор, 3 мл/кг). Кровь отбирали перед введением IRL1620, чтобы обеспечить значение в начальной точке. У крыс отбирали по 0,5 мл крови гепаринизированными шприцами в начальной точке, через 5, 30 минут и 2, 6 и 10 часов после введения паклитаксела. Образцы центрифугировали, и плазму собирали и хранили при -80°C до проведения анализа.

Образцы плазмы анализировали на содержание паклитаксела, используя систему ВЭЖХ. Кратко, плазму оттаивали и смешивали с 50 мкл н-циклогексилбензамида внутреннего стандарта (3 мм, более низкая стандартная кривая, и 30 мМ, более высокая стандартная кривая) и 3 мл этилового эфира (Fisher Scientific, Chicago, IL) в 13×100 стеклянных культуральных пробирках. Смесь встряхивали, используя возвратно-поступательный шюттельаппарат, в течение 5 минут и затем центрифугировали в течение 5 минут при 3000 оборотов в минуту при 4°C. Полученный супернатант переносили в 13×100 культуральные пробирки из

боросиликатного стекла и испаряли жидкость в потоке азота в нагреваемой водяной бане (37°C). Осадок восстанавливали, используя 200 мкл мобильной фазы А (50% деионизированная вода, 50% ацетонитрил). 100 мкл (более низкая стандартная кривая и образцы, собранные после IV введения) аликвоты восстановленного вещества

5 инъектировали в 4-мм 150×3,9 мм колонку C18 NovaPak (Waters Associates, Milford, MA), перед которой находилась 4-мм 20×3,9 мм предколонка C18 NovaPak, используя модуль для разделения Waters 2695, соединенный с абсорбционным детектором Waters 2487, установленным на 227 нм. Линейный градиент начинался со 100%-ой мобильной

10 фазы, закачиваемой со скоростью потока 1 мл/мин. Затем, начиная с 10-й до 11-й минуты, мобильную фазу А уменьшали до 70%, и с 11-й до 16-й минуты поддерживали мобильную фазу А на уровне 70% для удаления из колонки перед следующим введением медленно элюирующих веществ. Затем с 16-й до 17-й минуты мобильную фазу А увеличивали до 100% и в течение трех минут поддерживали 100%-й уровень

15 мобильной фазы А, обеспечивая полное время прогона, равное 20 мин. Концентрацию паклитаксела в плазме вычисляли из отношения области пика паклитаксела к пиковой области н-циклогексилбензамида, используя метод наименьших квадратов при линейном регрессионном анализе и 1/х взвешивание. Изменчивость в течение суток и посуточная изменчивость, даваемая коэффициентом вариации, составляла <10%. Сравнивали профили концентрации в плазме для нормальных крыс и крыс, имеющих опухоль.

Исследование с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика. Крыс анестезировали одной внутрибрюшинной инъекцией кетамина (100 мг/кг) вместе с

25 ксилазином (2 мг/кг). Шею выбривали и протирали хирургическим дезинфицирующим средством и спиртом. Правую сонную артерию обнажали и канюлировали путем введения стерильной трубки PE-50. В области шеи делали срединный надрез, и левую сонную артерию канюлировали путем введения трубки PE-50 для забора крови.

30 Катетеры водили подкожно и выводили наружу в основании шеи, затем надрезы закрывали, используя хирургические скобы. Buehler *et al.*, Free Radic Biol Med 37:124 (2004). Открытую трубку перекрывали рыболовной леской. Все хирургические операции выполняли в стерильных условиях. Чтобы предотвратить инфицирование раны наносили мазь с антибиотиком неоспорином (Pfizer, Morris Plains, NJ). Перед

35 введением лекарственного вещества предоставляли 45-минутный восстановительный период.

Животным с опухолью вводили i.v. IRL1620 дозой 3 нмоль/кг. [³H]паклитаксел (160 мкКю/кг) смешивали с немеченным паклитакселем. Паклитаксел вводили i.v. через 15

40 минут после введения наполнителя или IRL1620.

Плазму собирали перед введением наполнителя или IRL1620, чтобы обеспечить значение в начальной точке. У крыс отбирали примерно 0,2 мл крови гепаринизованными шприцами в начальной точке, через 1, 5, 15 и 30 минут и 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 часа. Образцы центрифугировали, и плазму отделяли и хранили при -80°C

45 до проведения анализа.

Концентрации [³H]паклитаксела в образцах плазмы измеряли, используя жидкостной сцинтилляционный счетчик Beckman Coulter (модель LS 6500). Кратко, плазму оттаивали и смешивали с 20 мл жидкого сцинтилляционного коктейля.

50 Производили измерение образцов, и количество отсчетов преобразовывали из единиц "dpm" (число распадов в минуту) в "фмоль/мл", используя следующую формулу:

$$\text{фмоль/мл} = \text{значение dpm} \times \text{коэффициент распада} \times 2,2 \times 10^{-12} / 10^{-12} \times \text{объем образца в мл.}$$

После преобразования в фмоль/мл вычисляли фармакинетику общего паклитаксела, используя отношение [^3H]паклитаксела к немеченному паклитакселю. Фармакокинетические оценки паклитаксела в плазме определяли, используя как некомпартментный, так и компартментный анализ, как описано в WinNonlin Pro 4.1 (Pharsight Corp, Mt. View, CA).

В некомпартментном анализе оценивали область под кривой ($\text{AUC}_{0-\infty}$), используя правило трапеции для последней поддающейся измерению концентрации (C_{last}), и экстраполировали на бесконечность путем деления C_{last} на отрицательное значение наклона терминального участка (λ) логарифмически-линейной кривой зависимости концентрации в плазме от времени. Также вычисляли следующие параметры: среднее время пребывания (MRT_{iv}) вычисляли как обратное значению λ , системный клиренс (CL) вычисляли как отношение дозы к $\text{AUC}_{0-\infty}$ и кажущийся объем распределения вычисляли как отношение CL к λ . Период полувыведения из плазмы вычисляли как произведение 0,693 (натуральный $\log 2$) на MRT_{iv} .

В компартментном анализе последовательность нелинейных компартментных моделей подгоняли к данным кривой зависимости концентрации в плазме от времени. В частности, сравнивали одно-компартментные, двух-компартментные и трех-компартментные модели. Тестировали взвешивание, основанное на однородных и предсказанных данных. Окончательный выбор модели был сделан на основе диагностических графиков (график зависимости наблюдаемые-предсказанные значения и график остатков), информационного критерия Акаике (AIC) и критерия Шварца (SC). Модель с более низкими критериями AIC и SC рассматривали как окончательную модель.

Данные анализировали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим проведением теста Дункана для ВЭЖХ-УФ анализа и при помощи t-критерия для анализа с использованием жидкостного сцинтиляционного счетчика. $P < 0,05$ считалось значимым. Основным результатом, измеренным в этих исследованиях фармакологического ответа, было изменение концентрации паклитаксела в плазме.

У нормальных крыс или крыс с опухолью введение IRL1620 (фиг.6 и 7) не влияло на фармакокинетический профиль паклитаксела. Фармакокинетический профиль в плазме согласно ВЭЖХ анализу аналогичен более обширному профилю распределения радиоактивного паклитаксела. На фиг.7 показан фармакокинетический профиль радиоактивности паклитаксела у крыс с опухолью, обработанных наполнителем и обработанных IRL1620. Фармакокинетический профиль анализировали, используя некомпартментный и компартментный подходы.

В некомпартментном анализе AUC, вычисленный для группы наполнитель + паклитаксел, был равен $9433,53 \pm 1465,00$ нг*ч/мл и был аналогичен ($p > 0,05$) значению для крыс с опухолью, обработанных IRL1620. Значение периода полувыведения было вычислено равным $0,14 \pm 0,08$ час. Клиренс, вычисленный как доза/AUC, был оценен равным $0,56 \pm 0,07$ л/ч/кг. Было найдено, что объем распределения, вычисленный как клиренс/ Kel , составляет $10,11 \pm 4,17$ л/кг. В целом, и как можно видеть из нижеприведенной таблицы, IRL1620 не влияет на фармакокинетический профиль паклитаксела.

группа	наполнитель + Paclitaxel	IRL1620
лямбда (ч)	$0,14 \pm 0,08$	$0,10 \pm 0,05$
С _{max} (мкг/мл)	$6,73 \pm 0,54$	$5,85 \pm 0,77$
$\text{AUC}_{0-\infty}$ (мкг-ч/мл)	$9,43 \pm 1,47$	$8,63 \pm 0,79$

Cl (л/ч/кг)	0,56±0,07	0,60±0,06
Vd (л/кг)	10,11±4,18	9,56±2,90
Vss (л/кг)	8,14±2,95	8,15±2,20
MRT _{irr} (ч)	17,43±8,13	14,48±4,70

5

Концентрацию паклитаксела в плазме вычисляли из отсчетов dpm в образцах плазмы. Фармакинетику паклитаксела лучше всего описывала трех-компарментная модель. На фиг.8 показаны графики сравнения наблюдаемых и предсказанных фармакинетик для крыс, обработанных как наполнителем, так и IRL1620. AUC паклитаксела у обработанных наполнителем крыс составлял 9,42±3,18 мкг-ч/мл. Объем распределения в состоянии стабильного равновесия (Vss) составлял 10,31±4,54 л/кг. Клиренс был оценен равным 0,69±0,17 л/ч/кг. $\alpha_{1/2}$, $\beta_{1/2}$, $\gamma_{1/2}$ равны 0,03±0,01 часа, 1,0±0,32 часа и 25,87±17,81 часов соответственно. Среднее время удержания было равно 27,92±19,84 часам. Как можно видеть из нижеприведенной таблицы, эти параметры, полученные для группы, обработанной IRL1620, незначительно отличались от значений, полученных для группы, обработанной наполнителем.

15

20

25

группа	наполнитель + Paclitaxel	IRL1620
AUC _{0-∞} (мкг-ч/мл)h/mL)	9,42±3,18	7,25±0,75
Cl (л/ч/кг)	0,69±0,17	0,72±0,09
MRT(ч)	27,92±19,84	10,58±3,20
Vss (л/кг)	10,31±4,54	7,28±1,79
α	0,03±0,01	0,04±0,01
β	1,0±0,32	0,84±0,32
γ	25,87±17,81	9,42±2,59
K ₁₀	3,14±1,34	1,72±0,57
K ₁₂	56,47±27,69	34,93±23,26
K ₁₃	5,71±3,37	3,92±1,88

30

35

40

В этом исследовании фармакокинетику паклитаксела в плазме лучше всего описывает трех-компарментная модель. Согласно этой модели предполагается, что паклитаксель распределен в различных органах независимо от того, является ли перфузия органов кровью высокой, средней или низкой. Введение IRL1620 не изменяет распределение паклитаксела. Фармакокинетические параметры в плазме, сгенерированные 3-компарментной моделью, показали сопоставимые значения клиренса, объемов распределения и абсорбции, распределения и периода полувыведения для групп, обработанных носителем и IRL1620. Однако IRL1620 увеличивает перфузию опухоли кровью и концентрацию паклитаксела в опухоли. Rai *et al.*, American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharmaceutics and Drug Delivery Conference. Philadelphia, PA (2004); Rai & Gulati, Cancer Chemother Pharmacol, 51:21 (2003). Следовательно, IRL1620 селективно увеличивает перфузию опухоли без значительного изменения фармакокинетического профиля паклитаксела.

45

50

Эти исследования показали, что использование IRL1620 не влияет на фармакокинетику паклитаксела. Часто фармакокинетику можно рассматривать в качестве идентификатора безопасности соединения. Следовательно, эти результаты также предполагают, что безвредность паклитаксела не изменяется в результате введения IRL1620. В результате, IRL1620 можно использовать для увеличения эффективности паклитаксела и возможности соответствующего титрования дозы для минимизации его сильной токсичности.

Пример 4. Ответное влияние дозы IRL1620, влияние IRL1620 на биораспределение [³H]паклитаксела в основных органах и тканях опухоли и влияние IRL1620 на

воздействие паклитаксела на статус опухоли

Эксперименты, описанные в данном примере, были спланированы для выполнения дополнительной оценки (а) ответного влияния дозы агониста EТ_В рецепторов, IRL1620, на перфузию молочной железы у нормальных крыс и крыс с опухолью, (б) влияния IRL1620 на биораспределение [³H]паклитаксела в основных органах и ткани опухоли и (3) влияния IRL1620 на воздействие паклитаксела на статус опухоли у крыс с MNU-индуцированной опухолью молочной железы.

Девственные самки крыс Sprague Dawley (Harlan Company, Madison, WI) были приобретены в возрасте 40 дней и размещены по две в клетке в условиях контролируемой комнатной температуры 23±1°C и поддерживаемого графика 12-часового освещения/12-часовой темноты. Крысы получали воду и стандартную диету для грызунов *ad libitum*.

IRL1620 был приобретен в Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). [³H]паклитаксел был приобретен в Moravek Biochemicals (Brea, CA). Паклитаксел (6 мг/мл раствор) был приобретен в Ben Venue Laboratories Inc. (Bedford, OH). Кетамин и ксилазин были приобретены в Phoenix Scientific, Inc. (St. Joseph, MO). Солюбилизатор ткани (TS-2) был приобретен в RPI Corp. (Chicago, IL).

В возрасте 48 дней каждое животное получило одну внутрибрюшинную инъекцию N-метилнитрозомочевины (MNU, Ash Stevens, Detroit, MI) с дозой 50 мг/кг. MNU растворяли в 3%-ой уксусной кислоте и разбавляли 0,9% NaCl (до конечной концентрации 12,5 мг/мл) и вводили в пределах 30 минут после приготовления. Такая обработка почти 100%-но индуцирует аденокарциному молочной железы у крыс примерно через 100 дней после обработки канцерогенным веществом. Mehta, Eur J Cancer, 36:1275 (2000). Появление и локализацию опухоли проверяли пальпированием молочной железы, и поверхность опухоли измеряли цифровым кронциркулем. Для исследования отбирали крыс, имеющих опухоль объемом 500-800 мм³.

Исследование перфузии. Перфузию в ткани и опухоли молочной железы у крыс измеряли, используя лазерный доплеровский флоуметр Periflux PF2b 4000 (Perimed, Stockholm, Sweden), как описано выше. Кратко, крыс обезболивали кетамином (100 мг/кг) и ксилазином (2 мг/кг) в виде одной объединенной внутрибрюшинной инъекции. Вокруг сосков выбривали мех, и животных помещали в электрогрелку (37°C), чтобы минимизировать температурные колебания. Вырезали кожу, окружающую молочные железы, размером примерно 6 мм в ширину и примерно 4 мм в длину. Оптоволоконный зонд стандартной модели (MP3 поточный зонд, Moors Instruments, Devon, England) прикладывали к поверхности обнаженной ткани. Затем соединяли его с лазерным доплеровским флоуметром Periflux PF2b 4000. Постоянную времени устанавливали на 1,5 секунды, а полосу пропускания устанавливали на 4 КГц. Этот способ измеряет доплеровский сдвиг луча лазера (поток), который определяется количеством и скоростью эритроцитов и пропорционален общему кровотоку для данного объема ткани. Значения потока получали, используя программное обеспечение Polyview. Перед введением физиологического раствора или IRL1620 получали 15-минутную начальную точку стабильной регистрации. Животным вводили 1, 3 или 9 нмоль/кг IRL1620 и регистрировали перфузию в течение 3 часов. Каждую дозу вводили по меньшей мере 4 животным.

Было обнаружено, что влияние введения IRL1620 на перфузию опухоли является временным и зависит от дозы (фиг.9А). Максимальное увеличение 244,0% (p<0,001) от начальной точки в перфузии опухоли наблюдалось через 30 минут после введения 3 нмоль/кг IRL1620. Было обнаружено, что увеличение перфузии было значимым

через 15, 30 и 60 минут по сравнению с начальной точкой, а также по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором (фиг.9А и 9В). Введение 1 и 9 нмоль/кг IRL1620 приводило только к незначительному увеличению перфузии опухоли молочной железы по сравнению с перфузией в начальной точке и перфузией у крыс, обработанных физиологическим раствором. Максимальное увеличение перфузии (60,9 и 63,3%) регистрировали через 120 и 30 минут после введения 1 и 9 нмоль/кг IRL1620 соответственно. Однако было обнаружено, что увеличение перфузии у животных, обработанных 9 нмоль/кг IRL1620, является значимым через 15, 30 и 60 минут по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором (фиг.9А). Введение физиологического раствора крысам с опухолью не вызывало никакого значительного изменения в перфузии кровью по сравнению с начальной точкой (фиг.9А). Введение физиологического раствора или 1, 3 или 9 нмоль/кг IRL1620 не вызывало никакого значительного изменения в перфузии молочной железы у нормальных самок крыс (данные не показаны).

Эти результаты показывают, что введение 3 нмоль/кг или 9 нмоль/кг IRL1620 приводит к увеличению перфузии опухоли по сравнению с начальной точкой и перфузией у крыс, обработанных наполнителем. Хотя введение каждой из доз, равных 1, 3 и 9 нмоль/кг IRL1620, увеличивает до некоторой степени перфузию опухоли, доза, равная 3 нмоль/кг, оказывает максимальное воздействие.

Изучение биораспределения. После формирования опухоли, как описано выше, крыс анестезировали кетамин (100 мг/кг) и ксилазином (2 мг/кг) в виде объединенной внутривенной инъекции. У крыс регистрировали массу тела, локализацию опухоли и объем опухоли. Затем животных группировали случайным образом для обработки физиологическим раствором или IRL1620 (3 нмоль/кг) через хвостовую вену с конечным объемом 0,2 мл. Затем крысам из каждой группы вводили [³H]паклитаксел (40 мкКю/крыса cremophor EL и этанол в соотношении 50:50) с конечным объемом 1,0 мл через 15, 120 и 240 минут после введения IRL1620. В каждой точке проводили исследование, используя шесть крыс, и всего было использовано 36 крыс. Животных умерщвляли через 3 часа после введения [³H]паклитаксела. Концентрацию [³H]паклитаксела определяли в ткани опухоли, почках, печени, легких и селезенке. В частности, опухоль и органы резали на тонкие небольшие кусочки. Примерно 500 мг ткани или опухоли помещали в отдельные флаконы, содержащие солубилизатор ткани (6 мл), и инкубировали на водяной бане при 50°C. Флаконы вынимали из водяной бани после растворения ткани или опухоли и добавляли 1,2 мл 10% ледяной уксусной кислоты. Содержимое флакона делили поровну между 3 флаконами, и в каждый флакон добавляли 15 мл жидкого сцинтилляционного коктейля (Safety Solve, RPI Corp, Chicago IL) и выдерживали в течение ночи для приведения в равновесное состояние. В пробирках измеряли радиоактивность, используя жидкостной сцинтилляционный счетчик (Beckman Coulter, LS 6500).

Концентрация [³H]паклитаксела в опухоли была значительно выше у крыс, обработанных IRL1620 (3 нмоль/кг), по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором. Максимальный эффект был отмечен в группе животных, которым вводили паклитаксел через 15 минут после введения IRL1620. Увеличение концентрации паклитаксела в опухоли, равное 277,1, 151,9 и 34,7%, наблюдали в случаях введения паклитаксела через 15, 120 и 240 минут соответственно после введения IRL1620 (фиг.10). Введение IRL1620 значительно не изменяло накопление паклитаксела в печени, легких, почках и селезенке по сравнению с контрольными

животными (фиг.10).

Изучение эффективности. Животные с опухолью (обработанные MNU) были разделены случайным образом на семь групп (по 12 крыс в каждой группе):

Группа I - физиологический раствор;

Группа II - IRL1620 (3 нмоль/кг);

Группа III - Cremophor EL:этанол;

Группа IV - наполнитель (физиологический раствор) + паклитаксел (1 мг/кг);

Группа V - наполнитель (физиологический раствор) + паклитаксел (5 мг/кг);

Группа VI - IRL1620 (3 нмоль/кг) + паклитаксел (1 мг/кг); и

Группа VII - IRL1620 (3 нмоль/кг) + паклитаксел (5 мг/кг).

График дозирования представлял собой одно введение каждые три дня, всего - 5 доз. Массу тела, размер и локализацию опухоли проверяли каждый третий день, всего в течение 30 дней после введения последней дозы. Для оценки использовались следующие категории: прогрессирующее: рост опухоли составляет более 40% по сравнению с ее площадью в начале лечения; стагнирование: в течение всего курса лечения опухоль меняется не более чем на 40% от своей первоначальной площади; частичный регресс: опухоль уменьшается более чем на 40% от своей первоначальной площади; полная ремиссия: опухоль становится непальпируемой или не поддается измерению; множественность опухолей: появление новых опухолей во время лечения; и 30-дневный период наблюдения. Животных умерщвляли через 30 дней после введения последней (5-ой) дозы. Данные анализировали, используя дисперсионный анализ с последующим проведением теста Дункана. Значимым считался уровень $p < 0,05$.

Масса тела. На фиг.11 приведено выраженное в процентах изменение массы тела животных, начиная с начальной точки (перед началом лечения) до 30 дня после введения последней дозы. Выраженное в процентах увеличение массы тела к концу эксперимента у контрольных крыс, обработанных физиологическим раствором, составило $7,2 \pm 1,7\%$ по сравнению с массой тела в начальной точке. В группе животных, обработанных наполнителем + паклитаксел (1мг/кг), наполнителем + паклитаксел (5 мг/кг), IRL1620 + паклитаксел (1 мг/кг) и IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг) (фиг.11), масса тела увеличилась на $5,1 \pm 3,6$; $9,4 \pm 2,4$; $14,3 \pm 3,1$ и $13,1 \pm 1,8\%$ соответственно. Было найдено, что выраженное в процентах увеличение массы тела у животных, которым вводили Cremophor EL:этанол и IRL1620, составляет $< 10\%$ по сравнению с начальной точкой (данные не показаны).

Объем опухолей. В начале лечения размеры опухолей в различных группах были сопоставимы и значительно не отличались друг от друга (фиг.12). Объем опухоли у контрольных крыс увеличивался быстро и с переменной скоростью. Большая изменчивость в росте опухоли может быть характерной для паттерна со случайным ростом у опухоли с автохтонным ростом. К концу 30-дневного периода наблюдения контрольные опухоли имели объем, равный $2693,4 \pm 790,9 \text{ мм}^3$. Крысы, обработанные IRL1620, имели аналогичный паттерн развития с конечным объемом опухоли $2560,5 \pm 844,4 \text{ мм}^3$. Обработка Cremophor EL:этанол также дала в результате аналогичный паттерн роста с конечным объемом опухоли, равным $2338 \pm 1329 \text{ мм}^3$. Таким образом, IRL1620 и cremophor EL:этанол сами по себе значительно не влияют на рост MNU-индуцированных опухолей молочной железы (данные не показаны). Крысы, обработанные наполнителем + паклитаксел (1 мг/кг), показали некоторое уменьшение роста опухоли в размере ($1960,8 \pm 611,9 \text{ мм}^3$). Группа, обработанная наполнителем + паклитаксел (5 мг/кг), показала большее уменьшение объема

опухоли ($1682,7 \pm 497,3 \text{ мм}^3$) по сравнению с контрольными крысами. Крысы, обработанные IRL1620 + паклитаксел (1 мг/кг), также показали уменьшение размера опухоли ($1707,2 \pm 621,1 \text{ мм}^3$). Однако самый маленький средний размер опухоли ($730,1 \pm 219,4 \text{ мм}^3$) наблюдался в группе животных, обработанных IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг). Введение IRL1620 с последующим введением 5 мг/кг паклитаксела в каждый третий день, всего 5 доз, значительно ($p < 0,05$) уменьшило объем опухоли по сравнению с крысами, которым вводили физиологический раствор + паклитаксел (5 мг/кг) (фиг.12). Также было обнаружено, что объем опухоли был меньше в группе, обработанной IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг), по сравнению с крысами, обработанными IRL1620 или Cremophor EL:этанол (данные не показаны).

Множественность опухолей. У животных во всех группах обработки к концу 30-дневного периода наблюдения развивались дополнительные опухоли. У животных, обработанных физиологическим раствором, Cremophor EL:этанол и IRL1620, увеличение в появлении дополнительных опухолей составило 58,4, 57,1 и 60,8% соответственно. Было найдено, что появление новых опухолей у животных, которым вводили наполнитель + паклитаксел (1 и 5 мг/кг, соответственно), составлял 78,3 и 41%. Однако, как было обнаружено, процент дополнительных опухолей у крыс, обработанных IRL1620 + паклитаксел (1 и 5 мг/кг, соответственно), составлял 69,2 и 44,8% (данные не показаны).

Прогрессирование опухолей. Процент опухолей, которые прогрессировали, находились в состоянии стазирования, уменьшались или исчезли, вычисляли, как описано выше. 73,5% опухолей в группе, обработанной физиологическим раствором, прогрессировало более чем на 40% от исходного размера опухоли. В группе, обработанной IRL1620 (82,7%) и Cremophor EL:этанол (80,4%), наблюдался аналогичный процент опухолей, прогрессировавших более чем на 40% от исходного размера опухоли. Более низкий процент опухолей прогрессировал в группах, обработанных наполнителем + паклитаксел (5 мг/кг) (71,4%), наполнителем + паклитаксел (1 мг/кг) (61,1%), и IRL1620 + паклитаксел (1 мг/кг) (69%). Но самый низкий процент (40%) наблюдался в группе, обработанной IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг) (фиг.13).

Стазирование опухолей. 16,9% опухолей у крыс, обработанных физиологическим раствором, находилось в состоянии стазирования, их рост не превышал 40% за 30 дней. Другие контрольные группы показали несколько более низкий процент опухолей, находившихся в состоянии стазирования: IRL1620 (13,7%), Cremophor EL:этанол (15,2%). Крысы, обработанные наполнителем + паклитаксел (1 мг/кг) (22,2%) и наполнителем + паклитаксел (5 мг/кг) (19,5%), показали более высокий процент опухолей, находившихся в состоянии стазирования. Крысы, обработанные IRL1620 + паклитаксел (1 мг/кг) (23,8%), и крысы, обработанные IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг), показали самый высокий процент опухолей, оставшихся в состоянии стазирования (26,6%) (фиг.13).

Регресс опухолей. Введение IRL1620 до обработки 5 мг/кг паклитаксела значительно уменьшало прогрессирование опухолей по сравнению с контрольными животными. Крысы, обработанные физиологическим раствором, показали 9,2% опухолей, объем которых уменьшился по сравнению с исходным объемом опухоли. Крысы, обработанные Cremophor EL:этанол (4,3%), IRL1620 (3,4%) и наполнитель + паклитаксел (1 мг/кг) (9,5%), незначительно отличались от контрольной группы по проценту опухолей, уменьшившихся в размере. К концу 5-ой дозы опухоли уменьшились на $76,1 \pm 10,5$ и $45,9 \pm 11,5\%$ у крыс, обработанных IRL1620 +

паклитаксел (5 мг/кг), и крыс, обработанных наполнителем + паклитаксел (5 мг/кг), соответственно, по сравнению с контрольными крысами. У животных, обработанных IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг) и наполнителем + паклитаксел (5 мг/кг), регресс составил $80,2 \pm 6,9\%$ ($p < 0,05$) и $33,8 \pm 19,4\%$ соответственно (фиг.13). Было найдено, что величина регресса опухоли в группах, обработанных IRL1620 + паклитаксел (1 мг/кг) и наполнителем + паклитаксел (1 мг/кг), составляла $47,1 \pm 15,4$ и $37,7 \pm 16,2\%$ соответственно. Введение паклитаксела (5 мг/кг) через 15 минут после IRL1620 вызывало более значимый регресс опухоли по сравнению с введением паклитаксела (5 мг/кг) через 15 минут после введения физиологического раствора. В группах, обработанных Cremophor EL:этанол и IRL1620, не наблюдалось значительного отличия в регрессе опухоли по сравнению с контрольными крысами в любой временной точке (данные не показаны).

Ремиссия опухоли. Полный регресс, когда опухоли полностью исчезли, наблюдался только в двух группах: крысы, обработанные IRL1620 + паклитаксел (1 мг/кг) (2,3%) и IRL1620 + паклитаксел (5 мг/кг) (15%) (фиг.13).

Результаты данных исследований эффективности указывают, что введение IRL1620 значительно увеличивает индуцированное паклитакселем уменьшение объема опухоли по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором, которым вводили паклитаксел. Улучшенный терапевтический эффект, наблюдаемый при дозе паклитаксела, равной 5 мг/кг, поддерживался в течение 30 дней после введения последней дозы. Это указывает на отсутствие рецидива в увеличении объема опухоли, и влияние IRL1620 на усиление эффективности паклитаксела оставалось постоянным до конца исследования. Однако обработка физиологическим раствором с последующим введением паклитаксела (1 и 5 мг/кг) не вызывала такого значительного изменения в росте опухоли. Кроме того, множественность опухолей уменьшилась в группе крыс, обработанных IRL1620 с последующим введением паклитаксела (5 мг/кг). Таким образом, введение IRL1620 до введения паклитаксела (5 мг/кг) значительно влияет на эффективность паклитаксела. На это указывают уменьшение опухолевой массы, процент регресса опухоли, не подвергшиеся воздействию масса тела и множественность. Более того, в группах животных, обработанных IRL1620 с последующим введением паклитаксела 1 и 5 мг/кг, соответственно, наблюдали полную ремиссию исходных опухолей, составляющую 2,3 и 15%, по сравнению с любой другой группой.

Исследования, описанные в этих примерах модели опухоли молочной железы, ясно показали, что агонист ET_B рецепторов, IRL1620, значительно усиливает кровоток в опухоли. Введение IRL1620 приводило к усилению кровотока в опухоли, тогда как перфузия здоровой контрольной ткани не изменялась. Увеличение перфузии опухоли продолжалось в течение 3 часов. Введение [³H]паклитаксела в окне увеличенной перфузии значительно увеличивало концентрацию [³H]паклитаксела только в опухолевой ткани, но не в других органах. Кроме того, результаты экспериментов, описанных в этом примере, свидетельствуют о том, что введение IRL1620 может стимулировать противоопухолевую эффективность паклитаксела. У крыс, которых каждый третий день обрабатывали паклитакселем (5 мг/кг), суммарно 5 дозами, сокращение объема опухоли составило 60,0% по сравнению с контрольными крысами. Однако регистрация спустя месяц после введения последней дозы паклитаксела показала, что введение паклитаксела через 15 минут после введения IRL1620 уменьшило объем опухоли до 268,9% по сравнению с контрольными крысами. У крыс, которым вводили IRL1620, сокращение объема опухоли составило 130,4% по

сравнению с крысами, обрабатываемыми только паклитакселем. Существует вероятность того, что увеличенная перфузия опухоли может увеличивать доступ питательных веществ, которые могут способствовать росту опухоли. Эти результаты показывают отсутствие какого-либо значительного увеличения в объеме опухоли и множественности опухолей у крыс, обработанных IRL1620, по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором, что указывает на то, что один IRL1620 не оказывает никакого влияния на объем и множественность опухолей.

Модель опухоли предстательной железы

Пример 5. Влияние IRL1620 на перфузию опухоли предстательной железы, биораспределение и эффективность доксорубина и 5-фторурацила

После демонстрации того, что IRL1620 может усиливать эффективность паклитаксела в модели опухоли молочной железы, также исследовали его эффект в модели опухоли предстательной железы. В частности, исследовали, может ли IRL1620 увеличивать противораковый эффект доксорубина (DOX) и 5-фторурацила (5-FU) в модели опухоли рака предстательной железы.

Для использования в описанных исследованиях модели опухоли предстательной железы отбирали пятинедельных крыс Copenhagen с опухолью предстательной железы (Harlan, Indianapolis, IN) весом 100-120 граммов. Животных содержали в условиях контролируемой температуры ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), влажности ($50 \pm 10\%$) и графике искусственного освещения по 12-часов свет/темнота (L0600-1800 ч). Крысы были размещены по три в клетке и получали пищу и воду *ad libitum*. Крысам давали возможность для акклиматизации к окружающей среде в течение по меньшей мере одной недели до ветеринарного обследования и начала проведения экспериментов. Все процедуры и уход за животными соответствовали правилам, установленным комитетом по уходу за животными университета штата Иллинойс в Чикаго. Условия содержания животных соответствовали федеральным правилам и были аккредитованы ассоциацией по аккредитации содержания лабораторных животных (American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care).

IRL1620 был приобретен в American Peptide (Sunnyvale, CA). [^{14}C]доксорубин гидрохлорид ([^{14}C]адриамицин) был приобретен в GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Кетамин и ксилазин были приобретены в Phoenix Scientific, Inc (St. Joseph, MO). Солюбилизатор ткани (TS-2) был получен от RPI Corp. (Chicago, IL).

Опухоли предстательной железы индуцировали у самцов крыс Copenhagen, используя JHU-4 (MAT-LyLu) клетки, полученные от ATCC (Manassas, VA). См. Gaddipati *et al.*, J Exp Ther Oncol, 4 (3): 203-12 (2004), который включен в настоящее описание во всей полноте в качестве ссылки. Клетки хранили в среде 1640 RPMI, дополненной эмбриональной бычьей сывороткой (10%), в увлажненном инкубаторе, содержащем 5% CO_2 , при 37°C . Животным выбривали волосы в области шеи со стороны спины и вводили клетки 10000 JHU-4 (MAT-LyLu) в 100 мкл фосфат-буферизованного физиологического раствора путем подкожной (s.c.) инъекции. Появление и локализацию опухоли отслеживали пальпированием, и измеряли диаметр опухоли при помощи цифрового кронциркуля. Экспериментальные процедуры начинали после того, когда размер опухоли достигал примерно 200 мм^3 .

Исследование перфузии. Крыс анестезировали, используя кетамин (100 мг/кг) и ксилазин (2 мг/кг) в виде объединенной внутривенной (i.p.) инъекции. В области опухоли выбривали мех, и животных помещали в электрогрелку (37°C), чтобы минимизировать температурные колебания. Отделяли участок кожи, окружающей ткань опухоли, размером примерно 3 мм в ширину и примерно 3 мм в длину, обнажая

опухоль. Оптоволоконный зонд стандартной модели, соединенный с лазерным доплеровским флуометром Periflux PF2b 4000 (MP3 поточный зонд, Moors Instruments, Devon, England), прикладывали к поверхности обнаженной опухоли. Постоянную
 5 времени устанавливали на 1,5 секунды, а полосу пропускания устанавливали на 4 кГц. Этот способ измеряет доплеровский сдвиг луча лазера (поток), который определяется
 числом и скоростью эритроцитов и пропорционален общему кровотоку в пределах
 10 данного объема ткани. Значения потока получали, используя программное обеспечение Polyview. Перед введением физиологического раствора или IRL1620 получали 15-минутную начальную точку стабильной регистрации. Животным вводили IRL1620 (1, 3, или 6 нмоль/кг) с конечным объемом 0,2 мл через хвостовую вену и регистрировали перфузию в течение 3 часов.

Как можно видеть на фиг.14А и 14В, введение физиологического раствора или 1
 15 нмоль/кг IRL1620 не вызывало у крыс с опухолью значительного изменения в перфузии опухоли кровью. Введение 3 нмоль/кг или 6 нмоль/кг вызывало максимальное увеличение перфузии опухоли кровью, равное 102,8% и 79,12% соответственно, по сравнению с начальной точкой. Такое увеличение перфузии было
 20 значимым через 15, 30, и 60 минут по сравнению с начальной точкой и крысами, обработанными физиологическим раствором ($p < 0,005$). Таким образом, соответствующие дозы IRL1620 временно увеличивали перфузию опухоли кровью в модели животных с раком предстательной железы.

Исследование биораспределения. Крыс с опухолью группировали случайным образом ($N=6$ /группа) для введения физиологического раствора или IRL1620 (1, 3 или 6
 25 нмоль/кг) через хвостовую вену с конечным объемом 0,2 мл. Затем, через 15 минут после введения физиологического раствора или IRL1620, крысы из каждой группы получали i.v. [^{14}C]доксорубин (1 мкКю/крыса) с конечным объемом 1,0 мл. Затем через 3 часа после введения [^{14}C]доксорубина животных умерщвляли. Исследовали
 30 концентрацию [^{14}C]доксорубина в опухоли, сердце, мозге, почках, печени, легких, костном мозге, предстательной железе, скелетной мускулатуре и селезенке. В частности, опухоль и органы резали на тонкие небольшие кусочки. Бедрa обеих ног отделяли и взвешивали, предварительно удалив костный мозг при помощи шприца, содержащего солубилизатор ткани. Примерно 500 мг ткани или опухоли помещали в
 35 отдельные флаконы, содержащие солубилизатор ткани (6 мл), и инкубировали на водяной бане при примерно 50°C. Флаконы вынимали из водяной бани после растворения ткани или опухоли и добавляли 1,2 мл 10% ледяной уксусной кислоты. Затем содержимое флакона делили поровну между 3 флаконами и в каждый флакон
 40 добавляли 15 мл жидкого сцинтилляционного коктейля (Safetz Solve, RPI Corp, Chicago, IL), и выдерживали в течение ночи для приведения в равновесное состояние. Подсчитывали радиоактивность в пробирках, используя жидкостной сцинтилляционный счетчик (Beckman Coulter, LS 6500).

Как можно видеть на фиг.15, введение 1 нмоль/кг IRL1620 не вызывало
 45 значительного изменения в усвоении [^{14}C]доксорубина опухолью или другими тканями. Однако концентрация [^{14}C]доксорубина в опухоли значительно увеличивалась у тех крыс, которым вводили 3 нмоль/кг IRL1620 (увеличение на 115,85%; $p < 0,01$) или 6 нмоль/кг IRL1620 (увеличение на 80,02%; $p < 0,05$), по
 50 сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором. Ни одна из доз IRL1620 не приводила к значительному увеличению накопления [^{14}C]доксорубина в сердце, мозге, почках, печени, легких, костном мозге, предстательной

железе, скелетной мускулатуре или селезенке по сравнению с контрольными животными. Таким образом, IRL1620 может селективно увеличивать доставку химиотерапевтических агентов в опухолевые ткани.

Изучение эффективности: Влияние IRL1620 на эффективность доксорубина (DOX)

В этом исследовании IRL1620 (N-сукцинил-[Glu9,Ala11,15]фрагмент эндотелина 8-21) был приобретен в American Peptides (Sunnyvale, CA). Доксорубин гидрохлорид (адриамицин, 2 мг/мл раствор) был приобретен в Ben Venue Laboratories Inc. (Bedford, OH). 5-фторурацил (50 мг/мл) был приобретен в Cadila Pharmaceuticals (Ahmedabad, India). Кетамин и ксилазин были приобретены в Phoenix Scientific, Inc. (St. Joseph, MO).

Опухоль предстательной железы индуцировали у пятинедельных самцов крыс Copenhagen (Harlan, Indianapolis, IN), как описано выше. Экспериментальные процедуры начинали проводить после того, когда размер опухоли достигал примерно 200 мм³. Животных с опухолью случайным образом делили на шесть групп (8 крыс/группа):

Группа I - физиологический раствор;

Группа II - IRL1620 (3 нмоль/кг);

Группа III - наполнитель (физиологический раствор) + DOX (2,5 мг/кг);

Группа IV- наполнитель (физиологический раствор) + DOX (5 мг/кг);

Группа V - IRL1620 (3 нмоль/кг) + DOX (2,5 мг/кг); и

Группа VI - IRL1620 (3 нмоль/кг) + DOX (5 мг/кг).

DOX растворяли в физиологическом растворе до конечного объема 1,0 мл и вводили через хвостовую вену через 15 минут после введения физиологического раствора или IRL1620. График дозирования представлял собой одно введение каждые три дня, всего 4 дозы. Массу тела и размер опухоли проверяли каждый третий день вплоть до 12-го дня после введения последней дозы. Животных умерщвляли через 12 дней после введения последней (4-ой) дозы. Опухоли отделяли и взвешивали, а ткани исследовали на очевидные метастазы. Ткани и опухоль консервировали в 10% буферизованном формалине для проведения гистологического анализа.

Масса тела. В группах крыс, обработанных только физиологическим раствором или IRL1620, наблюдали увеличение массы тела. Было обнаружено, что масса тела животных, обработанных только физиологическим раствором или IRL1620, в начале эксперимента составляла 152±6,97 и 148,8±2,52 г соответственно, а на 19 день исследования увеличилась до 178,8±4,7 и 175,72±2,35 г соответственно. Крысы, обработанные физиологическим раствором и DOX или IRL1620 и DOX, показали уменьшение массы тела. Обнаружено, что максимальное уменьшение массы тела составило 8,46±3,88 и 10,03±2,12 в группах крыс, обработанных физиологическим раствором + DOX (5 мг/кг) и IRL1620 + DOX (5 мг/кг), соответственно, на 13 день. Однако было найдено, что уменьшение массы тела в любой временной точке между любыми группами, которым вводили DOX с начала курса лечения, было незначительным (фиг.16А).

Объем опухоли. Объем опухоли у крыс, обработанных физиологическим раствором или IRL1620, увеличивался с высокой скоростью, и все крысы в этих группах были умерщвлены на 19 день из-за большой опухолевой массы. Все другие группы были умерщвлены на 22 день. У крыс, обработанных физиологическим раствором или IRL1620, на момент умерщвления объем опухоли составлял 10166±957 и 11033±873 мм³ соответственно. Было обнаружено, что объем опухоли у крыс, обработанных физиологическим раствором + DOX (2,5 мг/кг) и физиологическим

раствором + DOX (5 мг/кг) составлял 9102 ± 1442 и 4204 ± 299 мм³ соответственно. У крыс, обработанных IRL1620 + DOX (2,5 мг/кг), был зарегистрирован объем опухоли, равный 5544 ± 845 мм³. Самый низкий объем опухоли (1965 ± 332 мм³) наблюдали в группе крыс, обработанных IRL1620 + DOX (5 мг/кг). Было установлено, что уменьшение объема опухоли у крыс, обработанных IRL1620 + DOX (5 мг/кг), является значительным на 10, 13, 16, 19 и 22 день по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором + DOX (5 мг/кг) (фиг.16B).

Вес опухоли. На момент умерщвления крысы, обработанные физиологическим раствором, IRL1620 и физиологическим раствором + DOX (2,5 мг/кг), имели сравнимый вес опухоли ($19,14 \pm 1,8$; $20,77 \pm 1,64$ и $17,14 \pm 2,42$ г соответственно). Вес опухоли у крыс, обработанных физиологическим раствором + DOX (5 мг/кг); IRL1620 + DOX (2,5 мг/кг) и IRL1620 + DOX (5 мг/кг), на момент умерщвления, на 22-й день, уменьшился до $7,19 \pm 0,56$, $10,44 \pm 1,42$ и $3,31 \pm 1,64$ г соответственно. Значительное различие в весе опухоли наблюдалось между крысами, обработанными физиологическим раствором + DOX (5 мг/кг) и IRL1620 + DOX (5 мг/кг) ($p < 0,005$). Эти исследования показали, что IRL1620 значительно увеличивает противораковую эффективность DOX (Фиг.16C).

Изучение эффективности: Влияние IRL1620 на эффективность 5-фторурацила (5-FU)

В нижеприведенном исследовании использовали те же самые процедуры за исключением того, что для изучения влияния IRL1620 на эффективность 5-FU крысы, имеющие опухоль, были случайным образом поделены на шесть групп (6 крыс/группа):

Группа I - физиологический раствор;

Группа II - IRL1620 (3 нмоль/кг);

Группа III - носитель (физиологический раствор) + 5-FU (25 мг/кг);

Группа IV- носитель (физиологический раствор) + 5-FU (50 мг/кг);

Группа V - IRL1620 (3 нмоль/кг) + 5-FU (25 мг/кг); и

Группа VI - IRL1620 (3 нмоль/кг) + 5-FU (50 мг/кг).

5-FU растворяли в физиологическом растворе до конечного объема 1,0 мл и инъецировали через хвостовую вену через 15 минут после введения физиологического раствора или IRL1620. График дозирования и процедуры были такими же, что и в вышеописанном исследовании в отношении DOX.

Масса тела. Было найдено, что в начале эксперимента масса тела животных, обработанных физиологическим раствором или IRL1620, составляла $172 \pm 4,87$ и $176,9 \pm 6,19$ г соответственно, а на 16 день увеличилась до $200,3 \pm 2,57$ и $202,2 \pm 7,28$ г соответственно. Выраженная в процентах разница в увеличении веса животных, обработанных физиологическим раствором или IRL1620, на 16 день от начала эксперимента, как было найдено, составляла $16,17 \pm 1,64$ и $14,19 \pm 1,66$ соответственно. Масса тела крыс в других группах в начале лечения была сопоставимой и составляла $170,38 \pm 2,61$; $174,6 \pm 3,45$; $174,7 \pm 5,78$ и $179,45 \pm 2,53$ г соответственно для крыс, обработанных физиологическим раствором + 5-FU (25 мг/кг), физиологическим раствором + 5-FU (50 мг/кг), IRL1620 + 5-FU (25 мг/кг) и IRL1620 + 5-FU (50 мг/кг). Однако масса тела уменьшилась со временем следующим образом: физиологический раствор + 5-FU (25 мг/кг): $-5,46 \pm 3,39$; физиологический раствор + 5-FU (50 мг/кг): $-10,97 \pm 2,18$; IRL1620 + 5-FU (25 мг/кг): $-8,27 \pm 2,31$; и IRL1620 + 5-FU (50 мг/кг): $-11,20 \pm 2,41$ (фиг.17A).

Объем опухоли. У крыс, обработанных физиологическим раствором или IRL1620,

отсутствовало быстро прогрессирующее увеличение размера опухоли, и все крысы в этих группах были умерщвлены на 16 день из-за большой опухолевой массы. У крыс, которыми вводили физиологический раствор + 5-FU (25 мг/кг) и IRL1620 + 5-FU (25 мг/кг), не было никакого значительного различия в размере опухоли. Однако у крыс, обработанных IRL1620 + 5-FU (50 мг/кг), было отмечено непрерывное значительное уменьшение объема опухоли на 13, 16, 19 и 22 день по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором + 5-FU (50 мг/кг) (фиг.17B).

Вес опухоли. У крыс, которым вводили физиологический раствор или IRL1620, отсутствовали значительные различия в весе опухоли до их умерщвления на 16 день (вес составлял $17,92 \pm 2,01$ и $19,50 \pm 2,37$ г соответственно). У крыс, обработанных IRL1620 + 5-FU (25 мг/кг), вес опухоли уменьшился на 38,18% по сравнению с животными, которых обрабатывали физиологическим раствором + 5-FU (25 мг/кг). Кроме того, между крысами, обработанными IRL1620 + 5-FU (50 мг/кг), и физиологическим раствором + 5-FU (50 мг/кг), разница в весе опухоли составила 167,19% ($p < 0,01$) (фиг.17C). Эти результаты показывают, что IRL1620 значительно увеличивает действенность 5-FU на уменьшение объема опухоли и веса опухоли.

Все эти исследования показывают, что в модели животных с раком предстательной железы IRL1620 эффективен в усилении перфузии опухоли кровью, увеличении доставки химиотерапевтических агентов к опухоли и увеличении эффективности химиотерапевтических агентов.

МОДЕЛЬ МЕЛАНОМЫ

Пример 6. Влияние IRL1620 на перфузию опухоли и биораспределение паклитаксела

В описанных исследованиях модели меланомы использовали самцов мышей nude. Все процедуры и уход за животными соответствовали правилам, установленным комитетом по уходу за животными университета штата Иллинойс в Чикаго. Животных содержали в условиях контролируемой температуры ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), влажности ($50 \pm 10\%$) и на искусственном освещении (L0600-1800 ч). Условия содержания животных соответствовали федеральным инструкциям и были аккредитованы американской ассоциацией по аккредитации содержания лабораторных животных (American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care).

IRL1620 (N-сукцинил-[Glu9,Ala11,15]фрагмент эндотелина 8-21) был приобретен в Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). [^3H]паклитаксел был приобретен в Moravek Biochemicals (Brea, CA). Паклитаксел (6 мг/мл раствор) был приобретен в Ben Venue Laboratories Inc. (Bedford, OH). Кетамин и ксилазин были приобретены у Phoenix Scientific, Inc. (St. Joseph, MO). Солюбилизатор ткани (TS-2) был получен от RPI Corp. (Chicago, IL).

Для исследования использовали трансплантированную модель меланомы инокулированной клеточной линии. Мышам подкожно инокулировали один миллион клеток человеческой меланомы (UISO-MEL-2). Для исследования отбирали мышей с объемом опухоли, равным примерно $200-400 \text{ мм}^3$.

Изучение перфузии. Мышей ($N=4/\text{группа}$) анестезировали кетамином (150 мг/кг) и ксилазином (2 мг/кг) в виде объединенной внутрибрюшинной инъекции. Животных помещали в электрогрелку (37°C), чтобы минимизировать температурные колебания. На коже, окружающей опухоль, делали надрез длиной 10 мм, к поверхности обнаженной опухоли прикладывали оптоволоконный зонд стандартной модели,

соединенный с лазерным доплеровским флуометром Periflux PF2b 4000 (MP3 поточный зонд, Moors Instruments, Devon, England). Постоянную времени устанавливали на 1,5 секунды, а полосу пропускания устанавливали на 4 кГц. Значения потока получали, используя программное обеспечение Polyview. Перед введением физиологического раствора или IRL1620 (3 нмоль/кг) через хвостовую вену получали 15-минутную начальную точку устойчивой регистрации и регистрировали перфузию в течение 3 часов.

Введение физиологического раствора не приводило к значительному изменению в перфузии опухоли кровью у мышей с меланомой. Увеличение перфузии опухоли на 154,4%, 189,0%, 198,1%, 172,8% и 940,712% от начальной точки наблюдали через 30, 60, 90, 120 и 150 минут соответственно после введения IRL1620. Таким образом, IRL1620 значительно увеличивает перфузию опухоли кровью у мышей с меланомой по сравнению с контрольными мышами, обработанными физиологическим раствором. Этот эффект был временным и длился примерно 2 часа (фиг.18А и 18В).

Изучение биораспределения. Мышей, имеющих опухоль, анестезировали кетамин (150 мг/кг) и ксилазином (2 мг/кг) в виде объединенной внутрибрюшинной инъекции. Животных случайным образом распределяли на группы (N=4/группа) для введения физиологического раствора или IRL1620 (3 нмоль/кг) с конечным объемом 0,1 мл через хвостовую вену. Мыши в каждой группе также получали [^3H] паклитаксел (10 мкКю/мышь в 50:50 Cremophor EL:этанол), растворенный до концентрации 20:80 [^3H]паклитаксел: физиологический раствор, с конечным объемом 1,0 мл (i.v.) через 15 минут после введения физиологического раствора или IRL1620. Животных умерщвляли через 3 часа после введения [^3H]паклитаксела. Концентрацию [^3H]паклитаксела определяли в опухоли, сердце, почках, печени, легких и селезенке. Опухоль и органы резали на тонкие небольшие кусочки. 500 мг ткани или опухоли помещали в отдельные флаконы, содержащие солубилизатор ткани (6 мл), и инкубировали на водяной бане при 50°C. Флаконы вынимали из водяной бани после растворения ткани или опухоли и добавляли 1,2 мл 10% ледяной уксусной кислоты. Содержимое флакона делили поровну между 3 флаконами, в каждый флакон добавляли 15 мл жидкого сцинтилляционного коктейля (Safety Solve, RPI Corp., Chicago, IL) и выдерживали в течение ночи для приведения в равновесное состояние. Радиоактивность в пробирках подсчитывали, используя жидкостной сцинтилляционный счетчик (Beckman Coulter, LS 6500).

Как показано на фиг.19, у мышей, обработанных IRL1620, концентрация [^3H] паклитаксела в опухоли была значительно выше по сравнению с мышами, обработанными физиологическим раствором. Было определено, что концентрация [^3H] паклитаксела в опухоли составляла 40,77 и 274,28 нмоль/г в тканях животных, которым вводили физиологический раствор или IRL1620 соответственно за 15 минут до введения [^3H]паклитаксела. У животных, обработанных IRL1620, увеличение [^3H] паклитаксела в опухоли составило 572,99% по сравнению с мышами, обработанными наполнителем. Однако введение IRL1620 не приводило к значительному увеличению накопления [^3H]паклитаксела в сердце, почках, печени, легких или селезенке по сравнению с животными, обработанными физиологическим раствором. Таким образом, IRL1620 может значительно увеличивать усвоение и доставку паклитаксела к тканям опухоли, не влияя на его доставку к другим органам.

В заключении можно сделать вывод, что IRL1620 может использоваться в качестве вазодилататора, селективного в отношении опухоли, и может использоваться для

селективного увеличения доставки и эффективности химиотерапевтических агентов. Данное исследование очевидным образом демонстрирует, что, принимая эту терапевтическую стратегию, можно достичь многократного увеличения концентрации лекарственного вещества в опухолевых тканях. Наконец, для усиления кровотока в опухоли также были предложены антагонисты рецепторов ET_A (Sonveaux *et al*, Cancer Res, 64:3209 (2004)), которые также можно использовать для увеличения доставки противораковых лекарственных веществ в опухоль по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции, содержащие описанные активные ингредиенты, являются подходящими для введения людям или другим млекопитающим. Как правило, фармацевтические композиции являются стерильными и не содержат токсических, канцерогенных или мутагенных соединений, которые могли бы вызвать неблагоприятную реакцию при их введении. Фармацевтическую композицию можно вводить до, во время или после начала роста солидной опухоли.

Способ по настоящему изобретению может быть осуществлен с использованием активных ингредиентов, как описано выше, или активных ингредиентов в виде их физиологически приемлемых солей, производных, пролекарств или сольватов. Активные ингредиенты могут быть введены в виде чистого соединения или в виде фармацевтической композиции, содержащей один или оба ингредиента.

Фармацевтические композиции включают такие композиции, при помощи которых активные ингредиенты вводят в количестве, эффективном для достижения их назначения. Более конкретно, "терапевтически эффективное количество" означает количество, эффективное для предотвращения развития, устранения, замедления прогрессирования или для уменьшения размера солидной опухоли. Определение терапевтически эффективного количества хорошо известно специалисту в данной области техники, особенно в свете приведенного в настоящем описании подробного раскрытия.

"Терапевтически эффективная доза" относится к такому количеству активных ингредиентов, которое приводит к достижению желаемого эффекта. Токсичность и терапевтическая эффективность таких активных ингредиентов могут быть определены в соответствии со стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или с использованием экспериментальных животных, например, путем определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Отношение между дозами, имеющими токсический и терапевтический эффект, представляет собой терапевтический индекс, который выражается в виде отношения между LD₅₀ и ED₅₀. Предпочтителен высокий терапевтический индекс. Полученные данные можно использовать для определения диапазона дозирования в случаях применения людьми. Доза активных ингредиентов предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или отсутствием таковой. Доза может изменяться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого способа введения.

Точный состав и доза определяются лечащим врачом в зависимости от состояния пациента. Количество доз и интервал могут быть подобраны индивидуально для обеспечения таких уровней активных ингредиентов, которые достаточны для поддержания терапевтического или профилактического эффекта.

Количество вводимой фармацевтической композиции может зависеть от пациента, которому назначено лечение, его веса, тяжести заболевания, способа введения и оценки лечащего врача.

Активные ингредиенты могут вводиться по отдельности или совместно с фармацевтическим носителем, выбранным согласно назначенному способу введения и стандартной фармацевтической практике. Фармацевтические композиции для использования по настоящему изобретению, таким образом, могут быть составлены
5 обычным способом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемые носителей, включая разбавители и вспомогательные вещества, которые облегчают преобразование активных ингредиентов в препараты, которые могут использоваться фармацевтически.

При введении терапевтически эффективного количества активных ингредиентов композиция может быть представлена в виде непирогенного парентерально принимаемого водного раствора. Приготовление таких парентерально принимаемых растворов с требуемыми рН, изотоничностью, стабильностью и т.п., очевидно для специалистов в данной области техники. Предпочтительная композиция для
15 внутривенной инъекции обычно содержит изотонический наполнитель, хотя это не требуется.

Для использования в ветеринарии активные ингредиенты вводят в виде лекарственной формы, вводимой соответствующим образом, согласно обычной ветеринарной практике. Ветеринар может легко определить режим дозирования, который является наиболее подходящим для конкретного животного.

Могут быть выполнены и использованы различные виды адаптаций и модификации вариантов осуществления без отступления от объема и сущности настоящего изобретения, которые могут быть реализованы иначе, чем, в частности, представлено
25 в настоящем описании. Вышеупомянутое описание предназначено для иллюстрации и не является ограничивающим. Объем настоящего изобретения определяется только прилагаемой формулой изобретения.

Поскольку термины и выражения, которые использованы в настоящем документе, используются в качестве терминов, предназначенных для описания, а не ограничения, и при использовании таких терминов и выражений отсутствует намерение исключить эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, считается, что в рамках заявленного изобретения возможны различные модификации. Кроме того, один или несколько признаков любого варианта осуществления настоящего
35 изобретения могут быть объединены с одним или несколькими признаками любого другого варианта осуществления настоящего изобретения без выхода за пределы объема настоящего изобретения.

Если не определено иным образом, все числа, выражающие количество ингредиентов, свойства, такие как молекулярный вес, условия проведения реакций и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, должны пониматься как модифицируемые во всех таких случаях термином "примерно". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближениями, которые могут
45 изменяться в зависимости от желательных свойств, которые должны быть получены по настоящему изобретению. В заключении, не рассматривая это как попытку ограничить применение доктрины эквивалентности к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр следует рассматривать, по меньшей мере, как число, состоящее из указанных значимых цифр с учетом использования обычных способов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем настоящего изобретения, являются приближениями, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, даны с наиболее возможной
50

точностью. Однако любому числовому значению присуще наличие некоторых ошибок, которые являются прямым следствием стандартного отклонения, установленного при соответствующих измерениях во время тестирования.

Термины, указывающие на единственное число и аналогичные ссылки, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте нижеприведенной формулы изобретения), следует рассматривать как охватывающие как единственное, так и множественное число, если только в данном описании не указано противное или это явным образом не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании предназначено только для того, чтобы служить в качестве способа условного обозначения независимой ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в данный диапазон. Если в настоящем описании не указано противоположное, каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было раскрыто в настоящем описании отдельно. Все раскрытые в настоящем описании способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящем описании не обозначено иное или это каким-либо образом явно не противоречит контексту. Использование любого примера или формулировки, обозначающей пример (например, "такой как"), приведенной в настоящем описании, предназначено только для того, чтобы лучше раскрыть изобретение, и не служит для ограничения объема настоящего изобретения, заявленного иным образом. Никакую формулировку в описании не следует рассматривать как указание на какой-либо незаявленный элемент, существенный для реализации настоящего изобретения.

Группировка альтернативных элементов или вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытых в настоящем описании, не должна рассматриваться в качестве ограничения. Каждый член группы может быть упомянут и заявлен отдельно или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, содержащимися в настоящем описании. Предполагается, что один или несколько членов группы могут быть включены в группу или удалены из нее по причине удобства и/или патентоспособности. В случае любого такого включения или удаления предполагается, что описание содержит такую группу, модифицированную таким образом, чтобы реализовать описание всех групп Маркуша (Markush groups), используемых в прилагаемой формуле изобретения.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения раскрыты в настоящем описании как включающие наилучший способ осуществления изобретения, известный изобретателям. Конечно, изменения таких конкретных вариантов осуществления станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Автор ожидает, что специалист использует такие изменения соответствующим образом, и подразумевает, что изобретение может быть реализовано иным способом, чем, в частности, раскрыто в настоящем описании. Следовательно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, раскрытого в формуле изобретения, приложенной к данному описанию, как разрешено согласно применяемому закону. Кроме того, согласно изобретению охвачена любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах, если в настоящем описании не обозначено иное или это явным образом не противоречит контексту.

Кроме того, в описании приведены многочисленные ссылки на патенты и публикации. Каждая из вышеупомянутых в описании ссылок и публикаций включена в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

В заключение, необходимо понять, что варианты осуществления раскрытого в

описании настоящего изобретения являются иллюстративными в отношении принципов настоящего изобретения. Другие модификации, которые могут быть использованы, находятся в объеме настоящего изобретения. Таким образом, путем примера, а не ограничения, альтернативные конфигурации настоящего изобретения могут быть использованы в соответствии с раскрытием, приведенным в настоящем описании. Следовательно, настоящее изобретение не ограничено только тем, что показано и описано.

Формула изобретения

1. Способ, способствующий лечению рака предстательной железы, включающий введение агониста ET_B IRL1620 и химиотерапевтического агента, выбранного из доксорубицина и 5-фторурацила (5-FU), где указанный IRL1620 селективно увеличивает снабжение кровью опухоли предстательной железы.

2. Способ по п.1, в котором указанный доксорубицин вводят в количестве от примерно 2 нмоль/кг до примерно 6 нмоль/кг.

3. Способ по п.2, в котором указанный 5-FU вводят в количестве от примерно 25 до примерно 50 мг/кг.

4. Способ по п.1, в котором указанное увеличение указанного снабжения кровью указанной опухоли предстательной железы увеличивает доставку указанного химиотерапевтического агента в указанную солидную опухоль предстательной железы.

5. Способ по п.1, в котором указанный агонист ET_B и указанный химиотерапевтический агент вводят, по существу, одновременно.

6. Способ по п.5, в котором указанный агонист ET_B и указанный химиотерапевтический агент вводят в виде одной композиции.

7. Способ по п.1, в котором указанный агонист ET_B и указанный химиотерапевтический агент вводят последовательно.

8. Способ по п.7, в котором указанный химиотерапевтический агент вводят перед указанным агонистом ET_B , или указанный агонист ET_B вводят перед указанным химиотерапевтическим агентом.

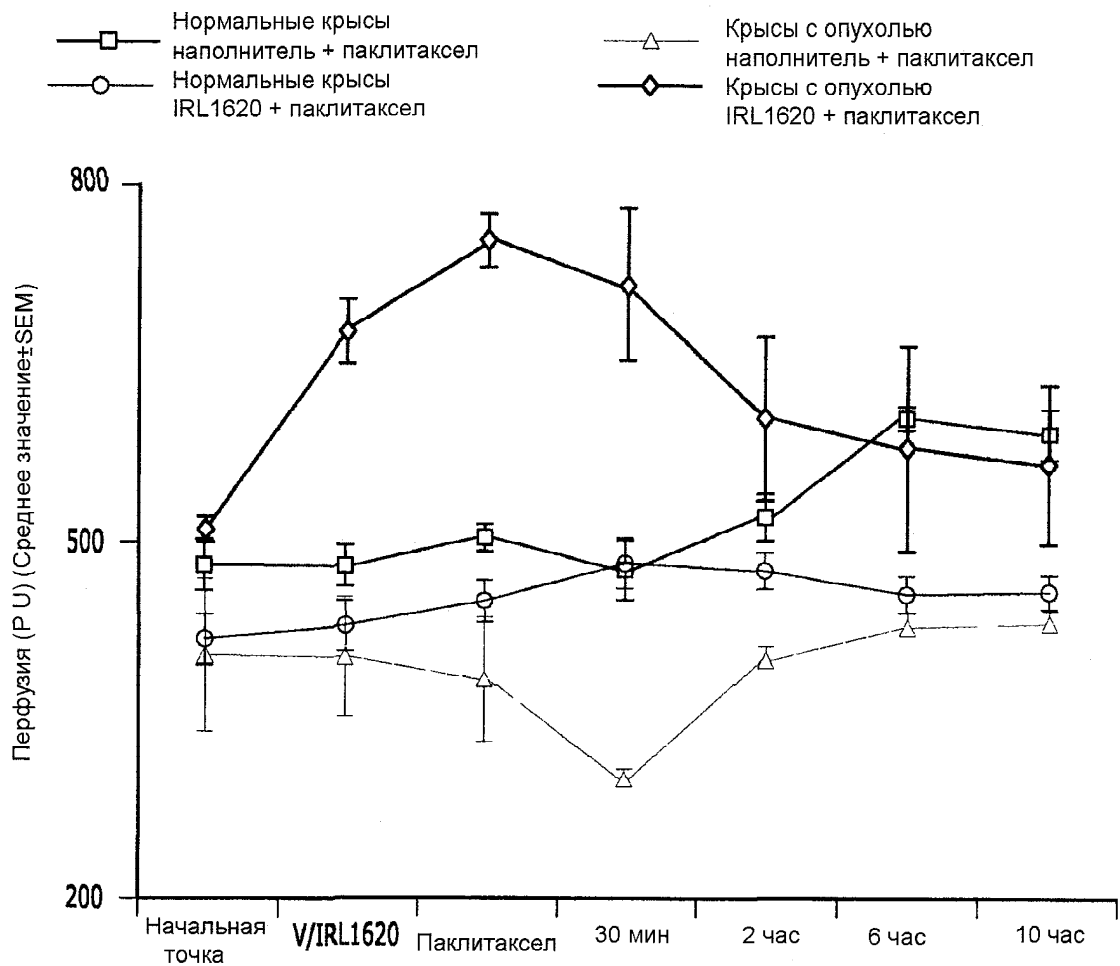
9. Изделие, содержащее композицию, содержащую в качестве активного ингредиента агонист ET_B IRL1620 и инструкцию по введению указанной композиции с химиотерапевтическим агентом, выбранным из доксорубицина и 5-FU для лечения солидной опухоли предстательной железы.

10. Изделие по п.9, дополнительно содержащее указанный химиотерапевтический агент.

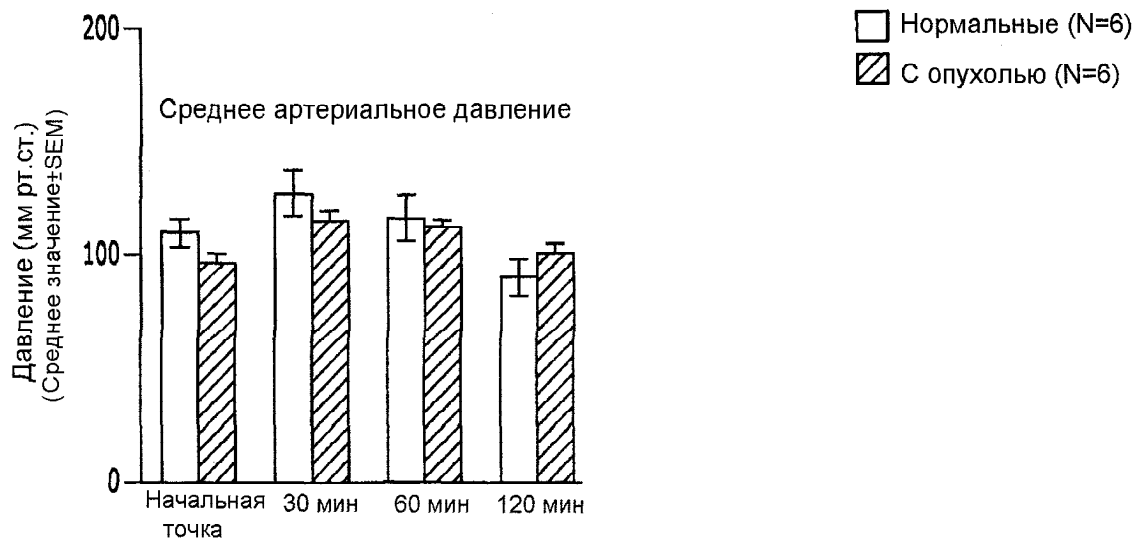
11. Изделие по п.10, в котором указанный агонист ET_B и указанный химиотерапевтический агент являются частью одной и той же композиции, находятся в виде отдельных композиций или являются и тем и другим.

12. Изделие по п.10, в котором указанный доксорубицин вводят в количестве от примерно 2 до примерно 6 нмоль/кг.

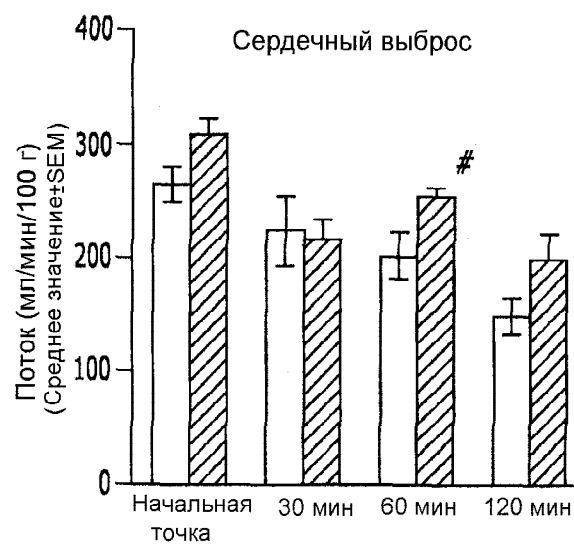
13. Изделие по п.10, в котором указанный 5-FU вводят в количестве от примерно 25 до примерно 50 мг/кг.



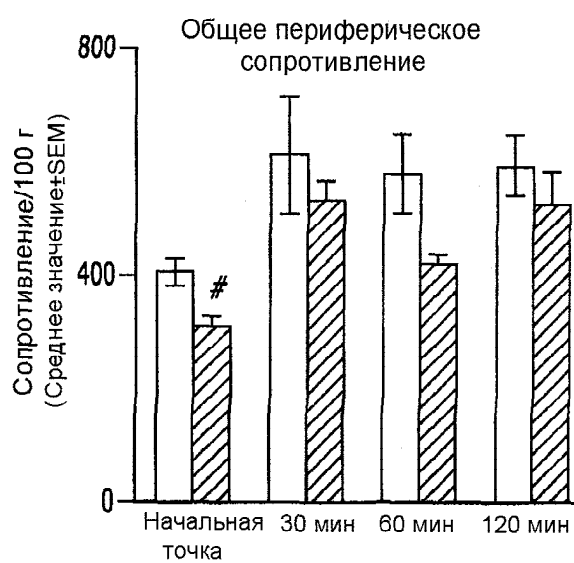
ФИГ.1



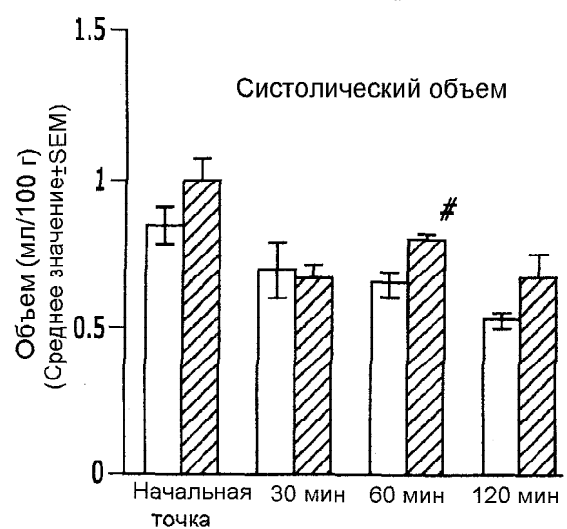
ФИГ.2А



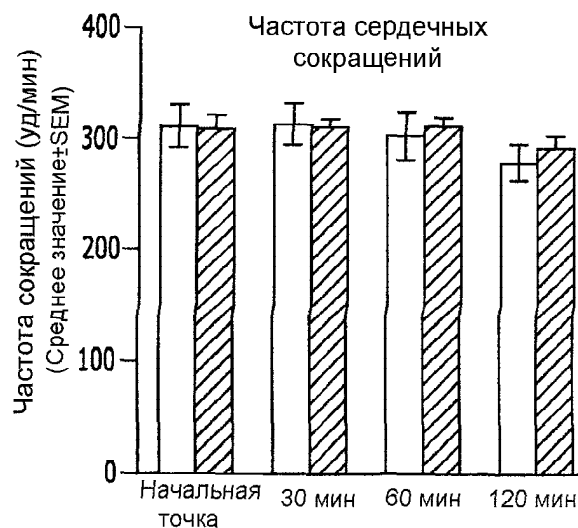
ФИГ.2В



ФИГ.2С

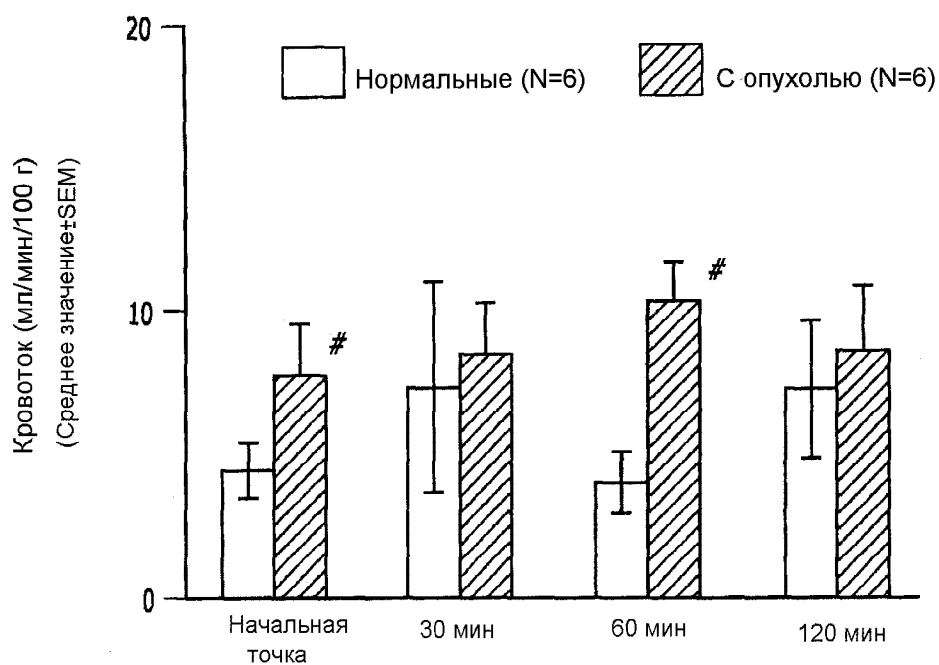


ФИГ.2D



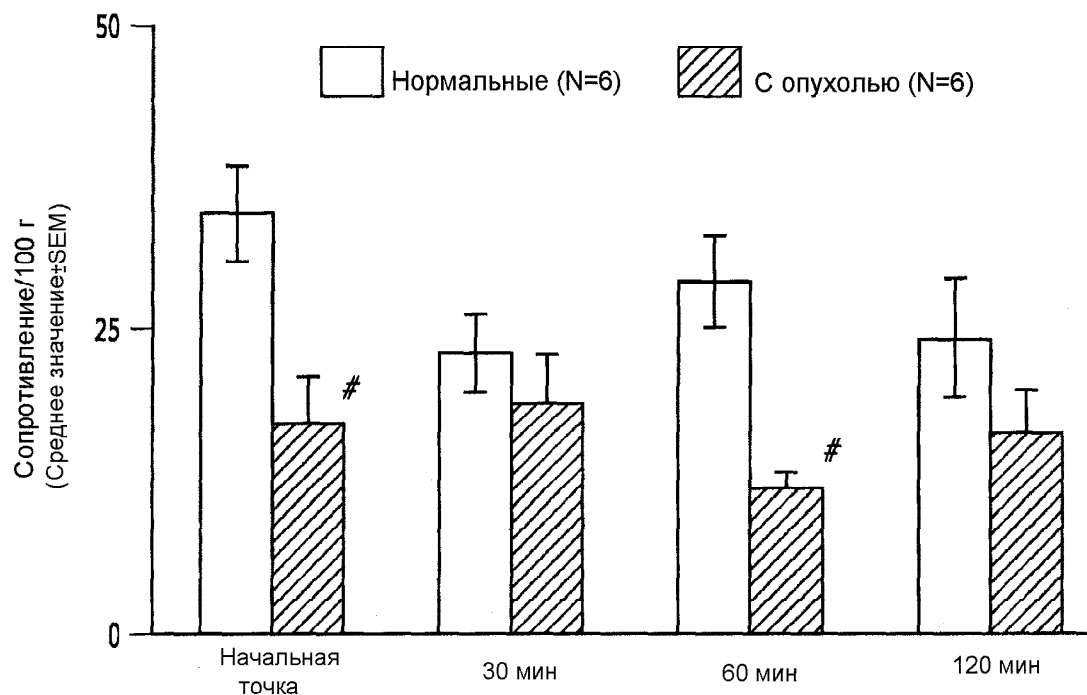
ФИГ.2Е

Кровоток в молочной железе

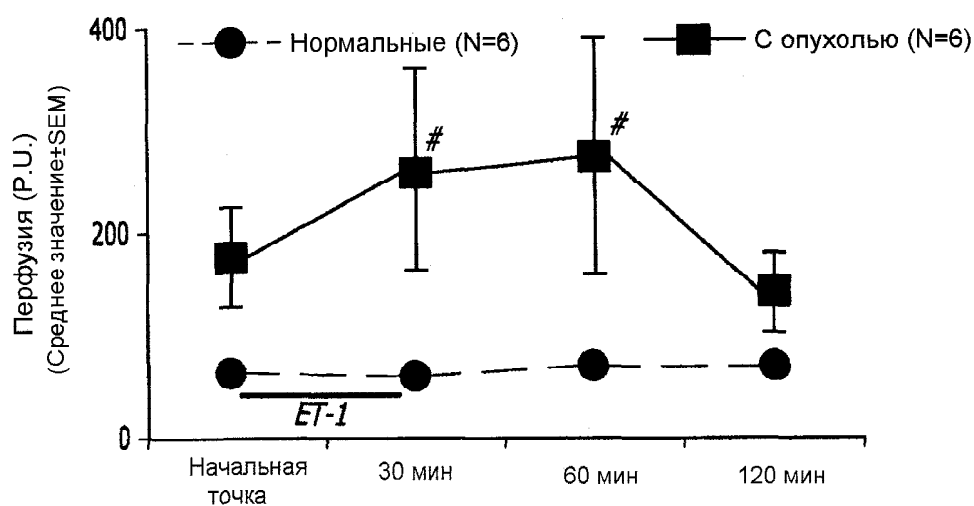


ФИГ.3А

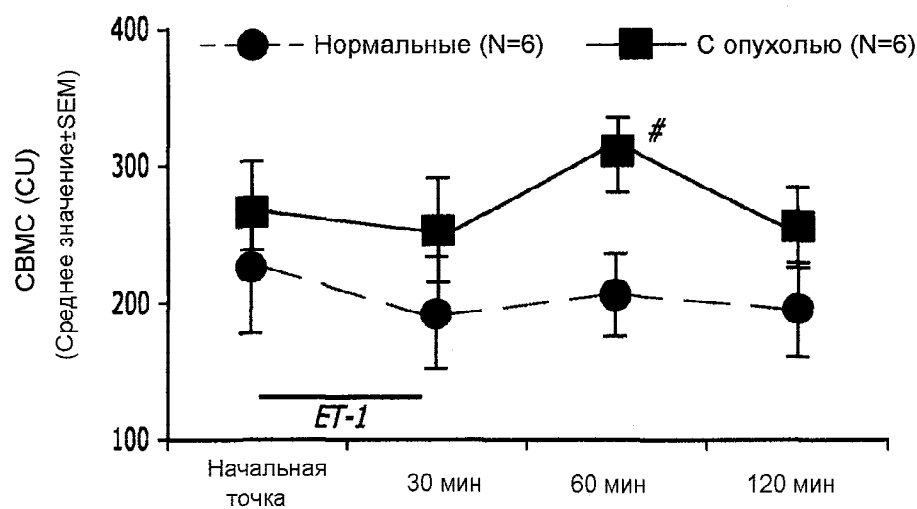
Сосудистое сопротивление в молочной железе



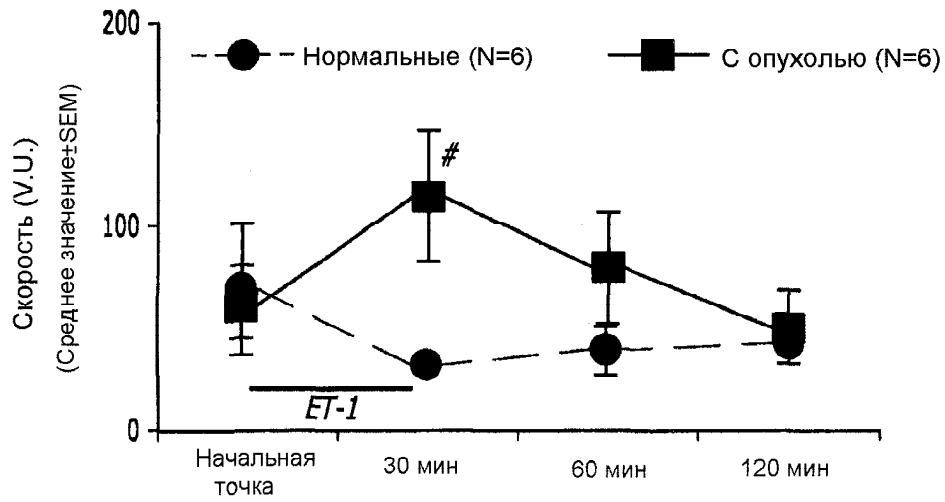
ФИГ.3В



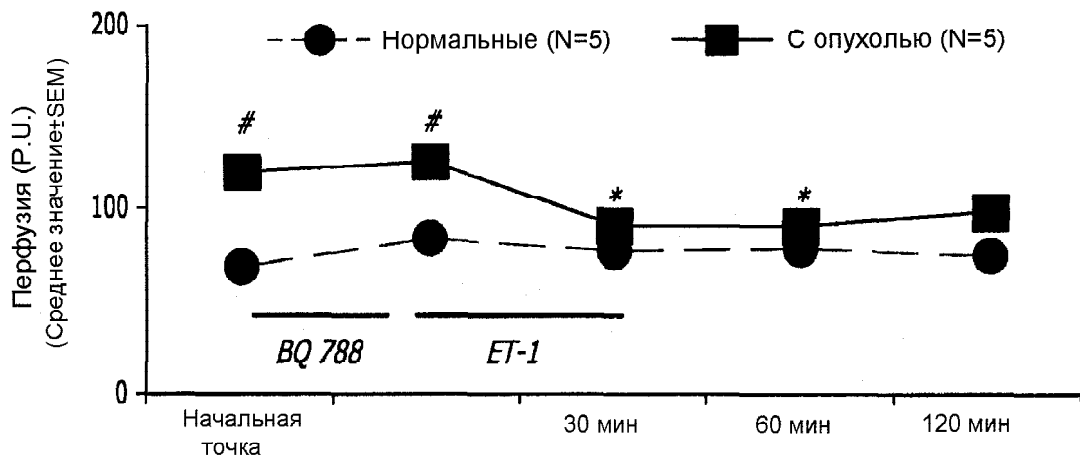
ФИГ.4А



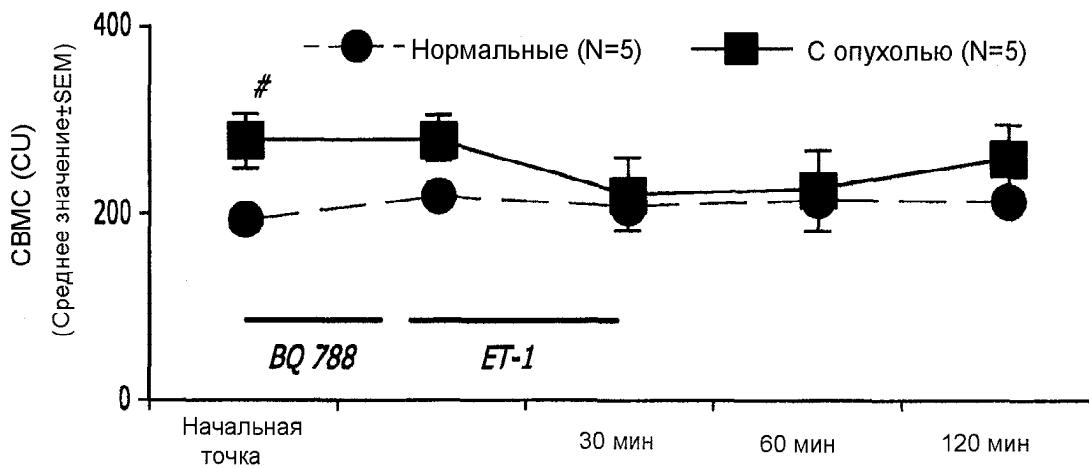
ФИГ.4В



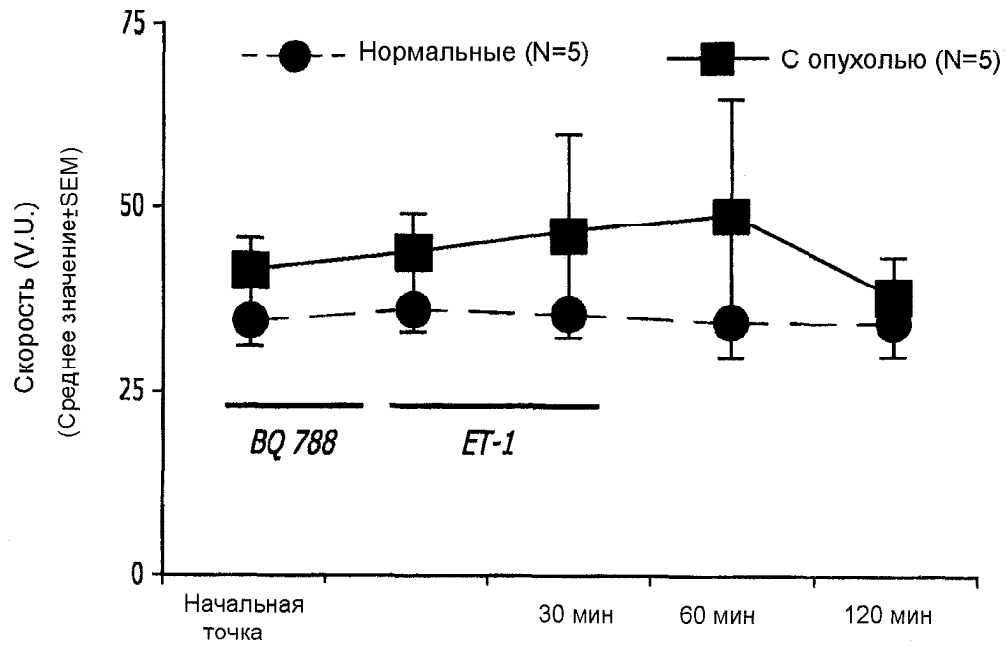
ФИГ.4С



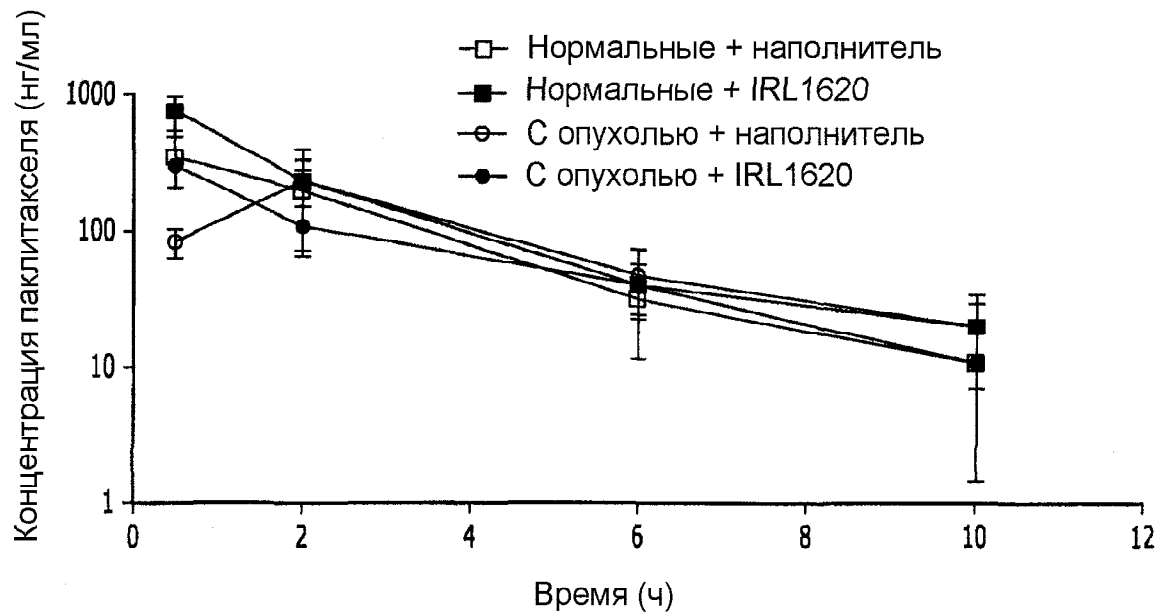
ФИГ.5А



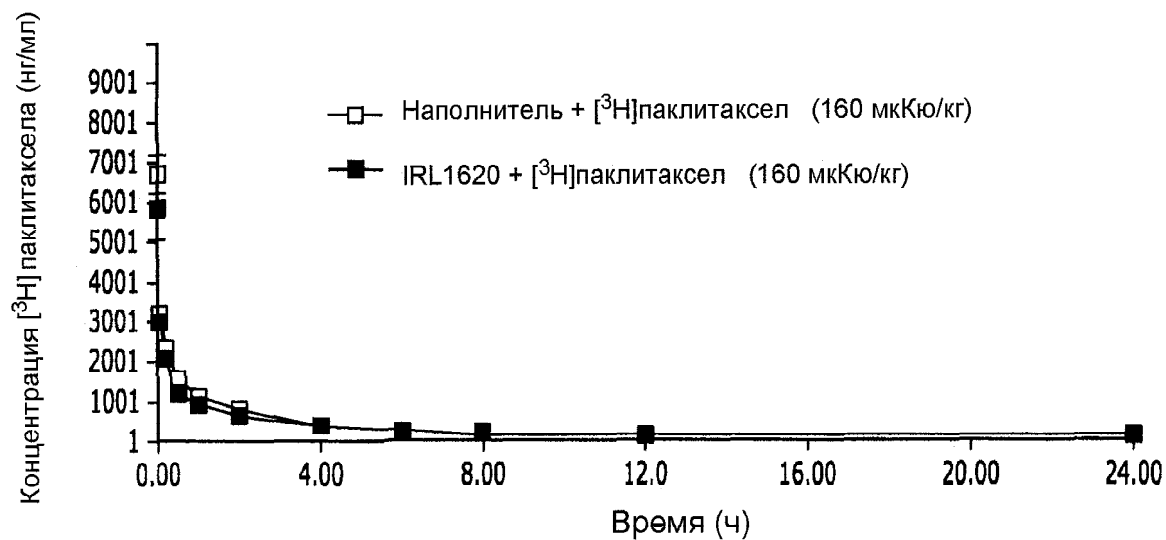
ФИГ.5В



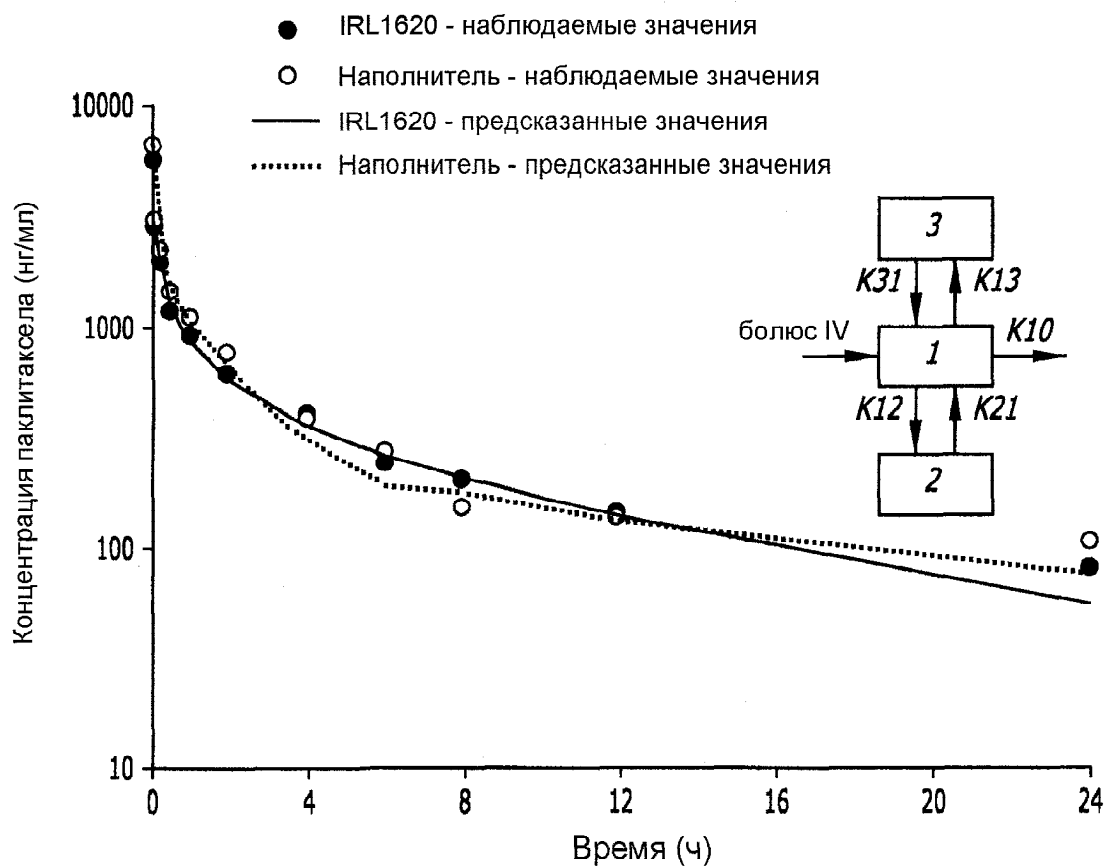
ФИГ.5С



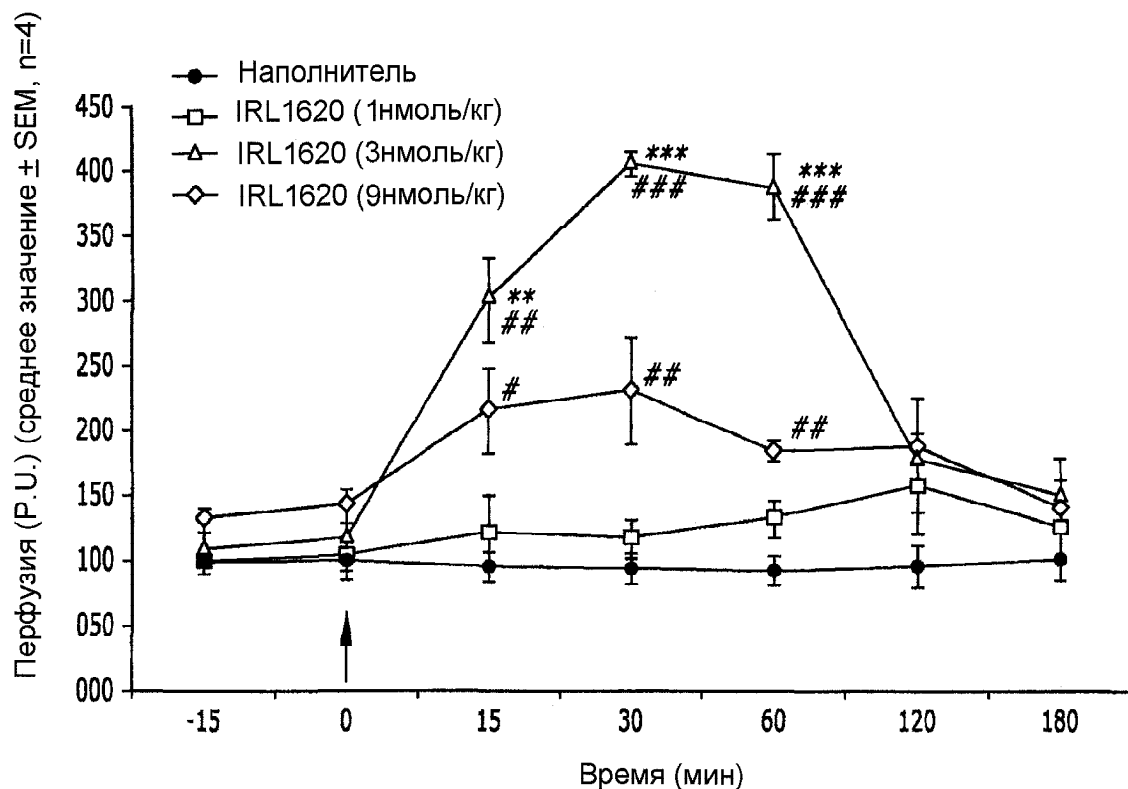
ФИГ.6



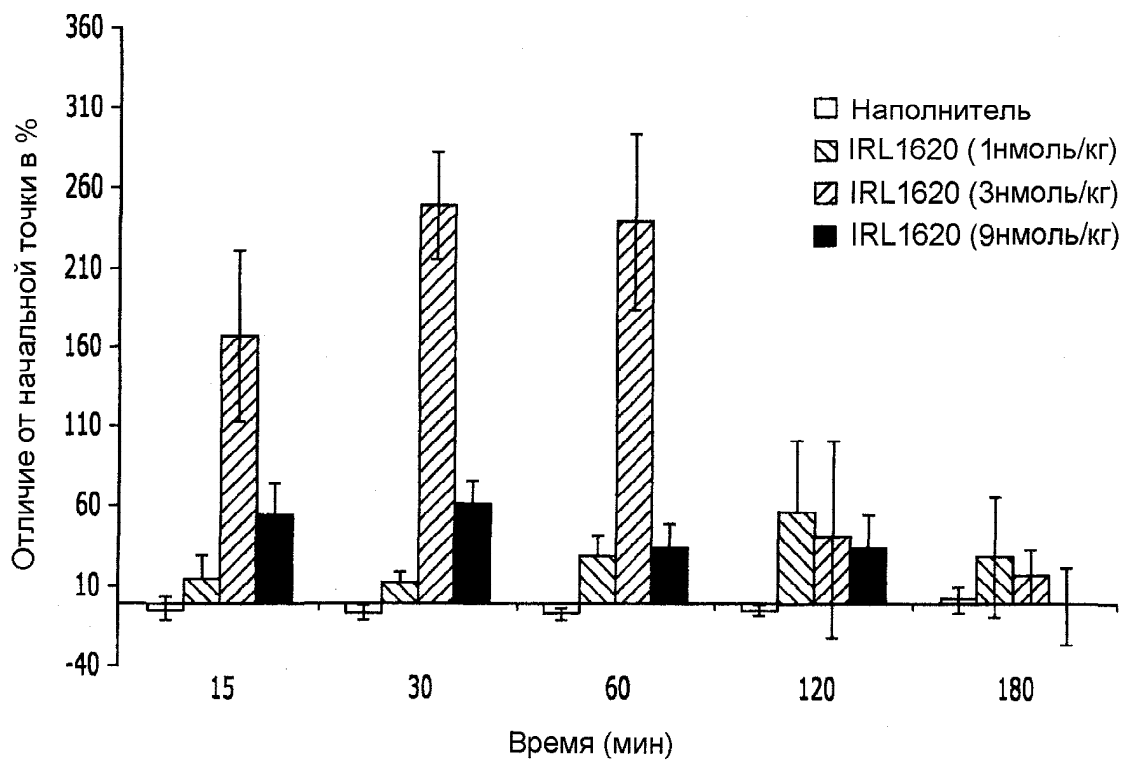
ФИГ.7



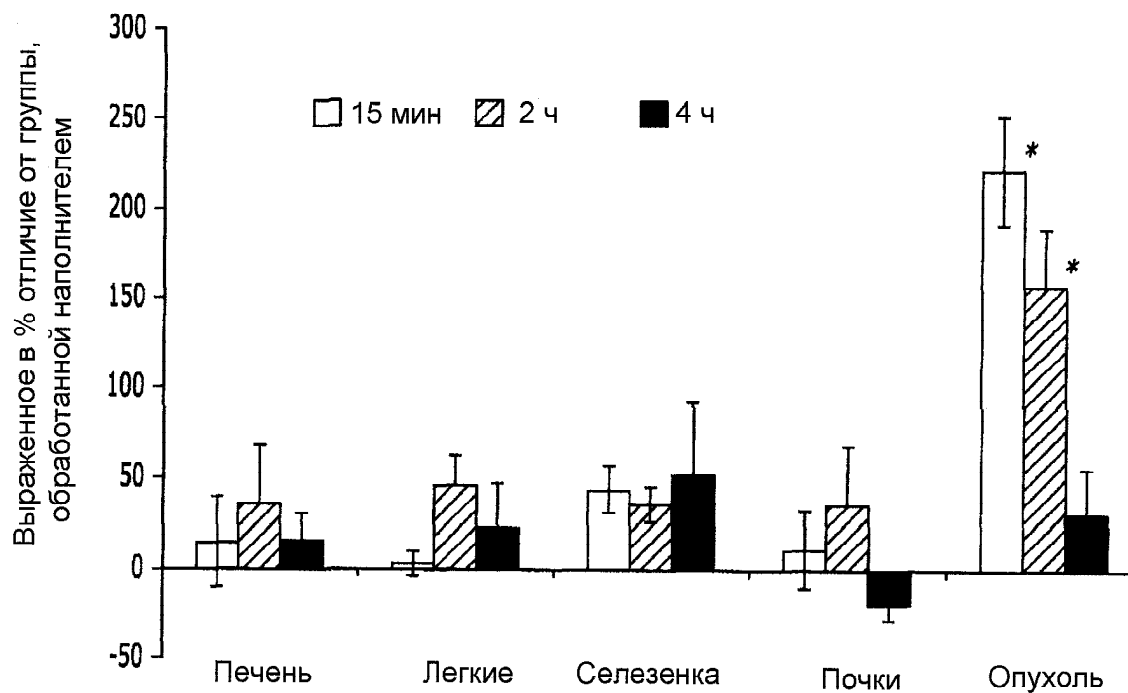
ФИГ.8



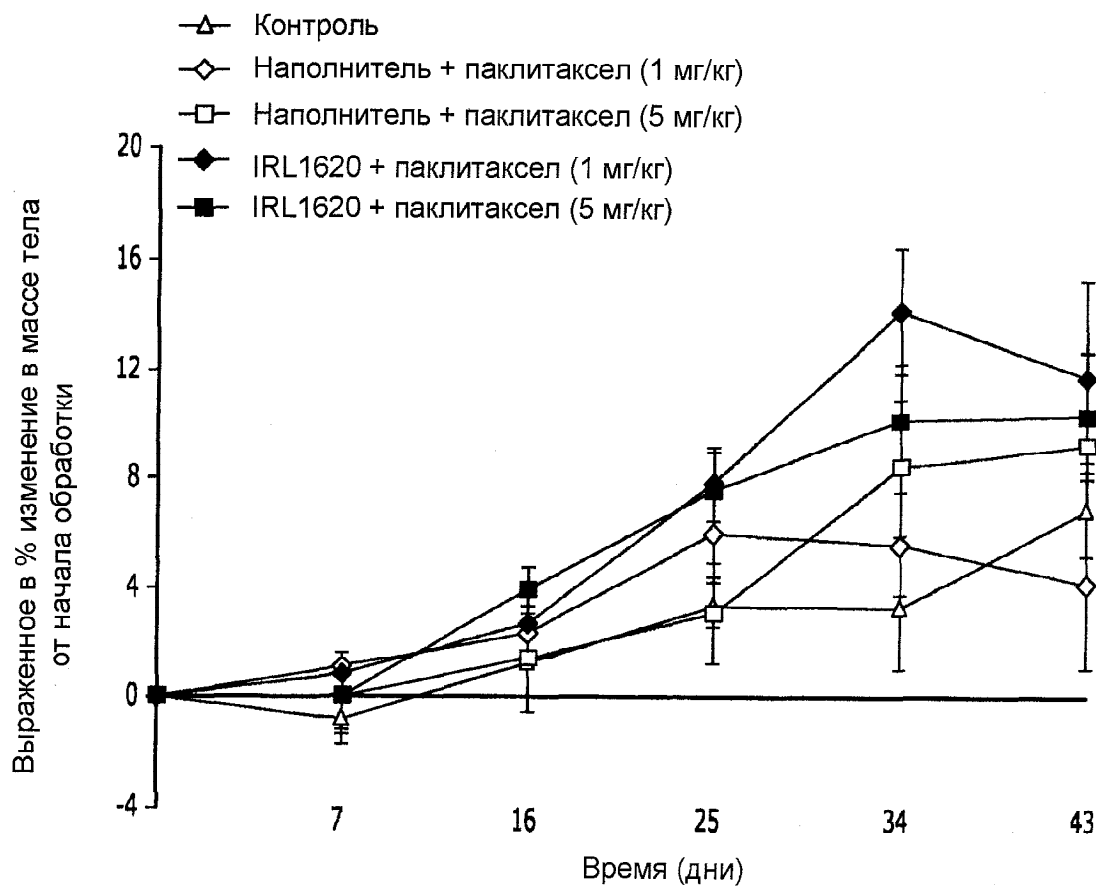
ФИГ.9А



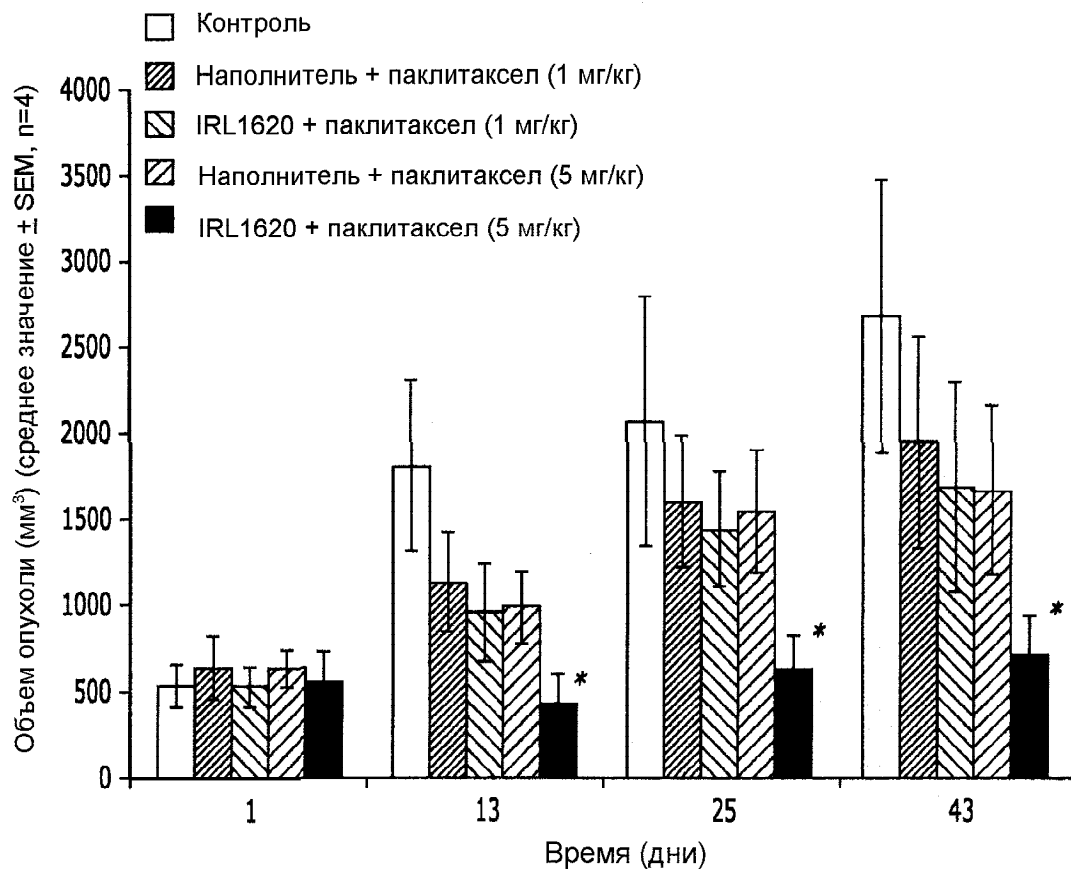
ФИГ.9В



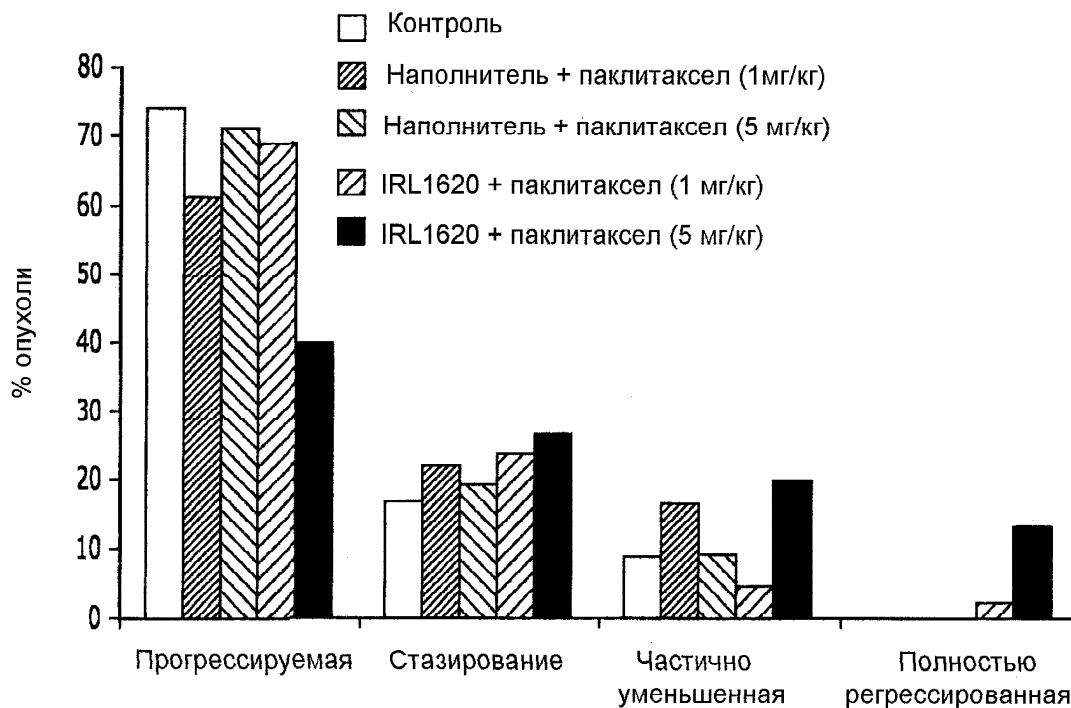
ФИГ.10



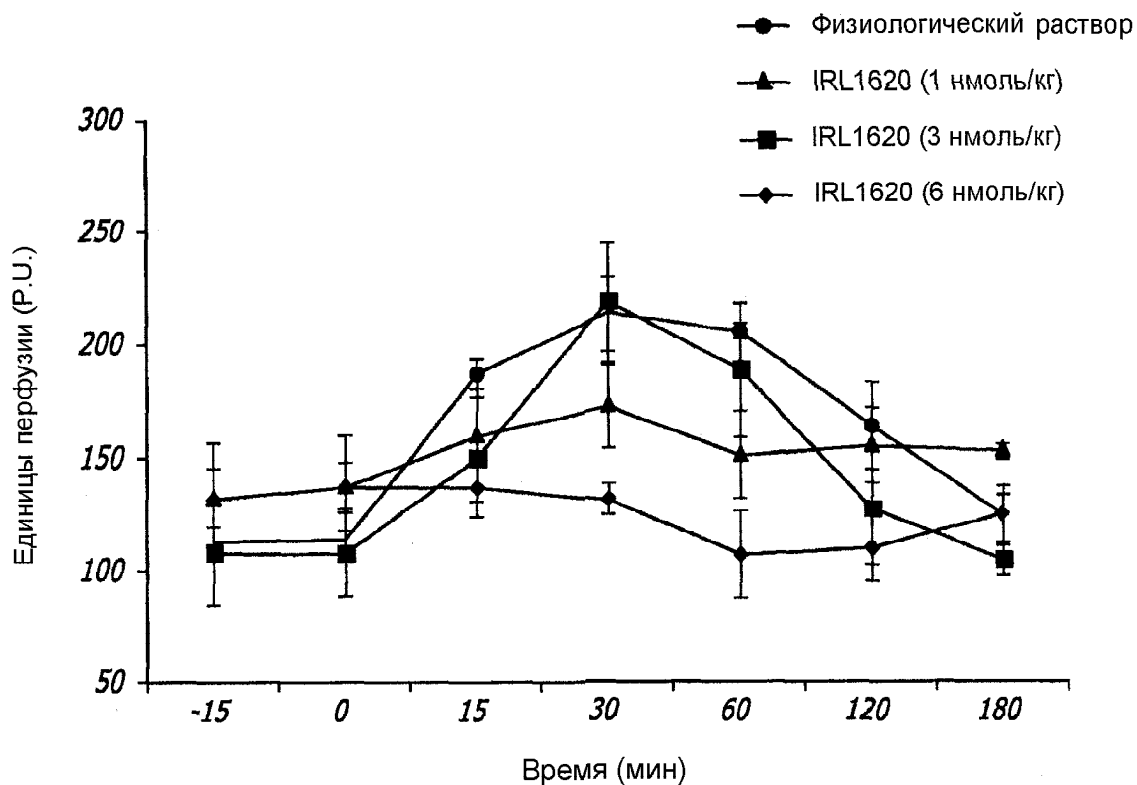
ФИГ.11



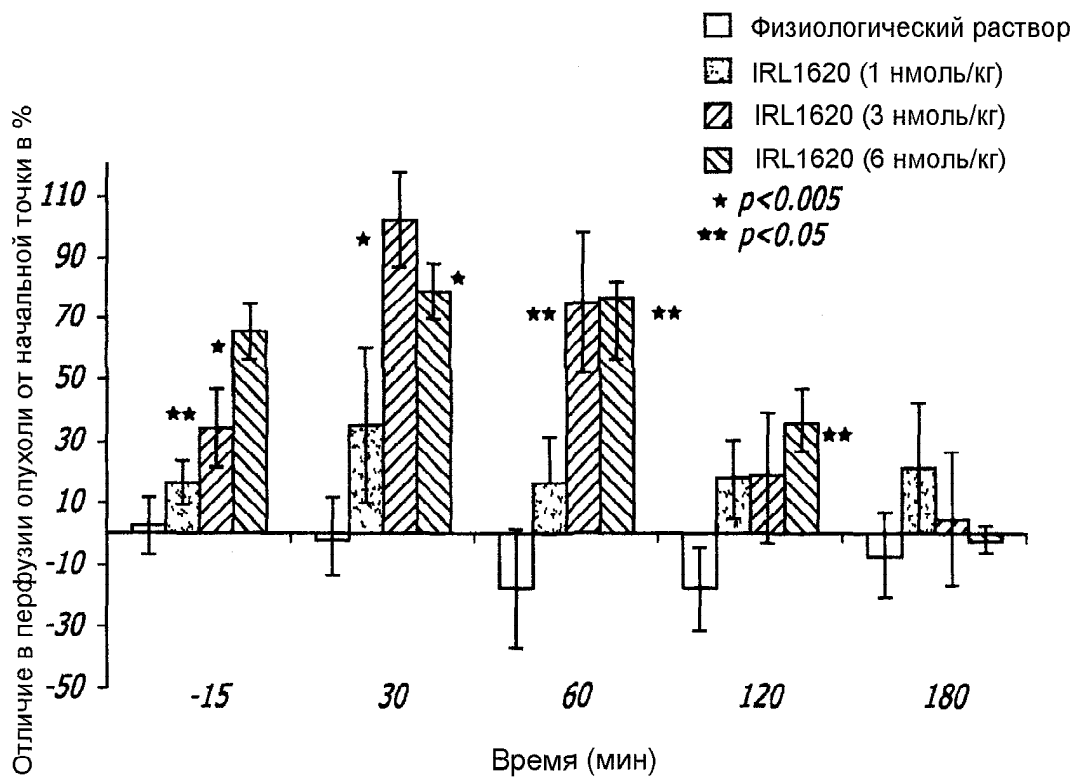
ФИГ.12



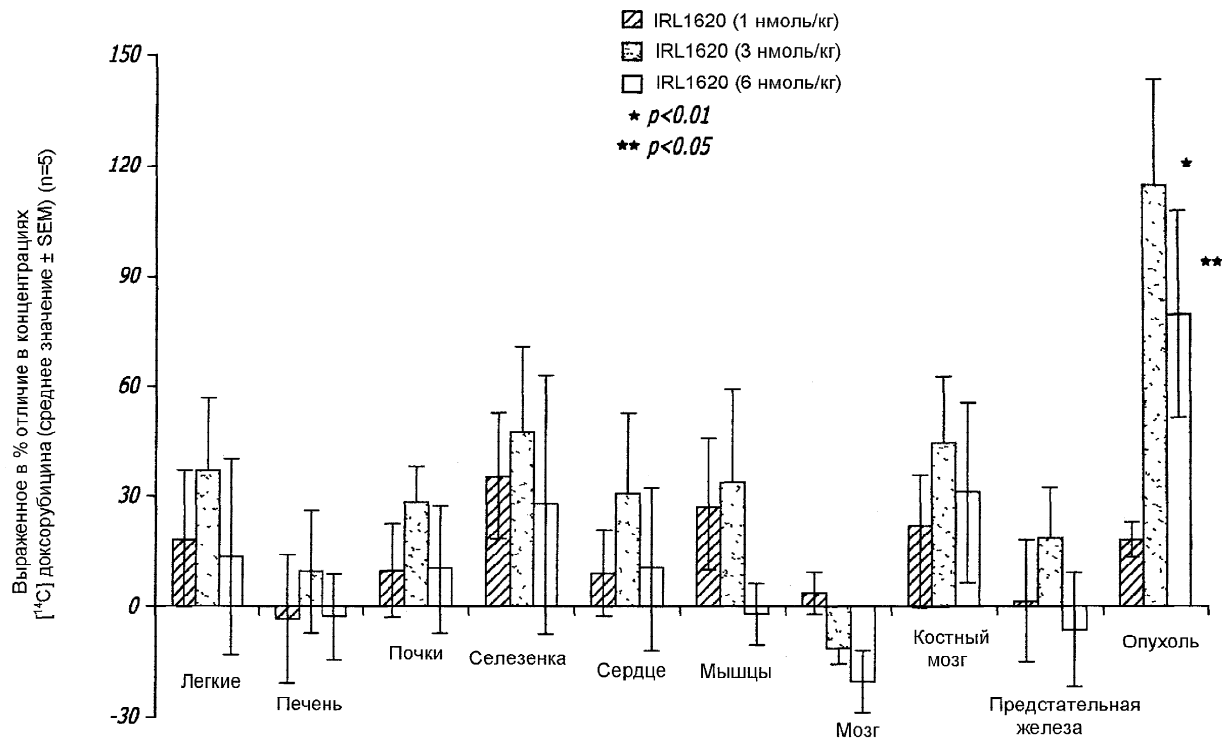
ФИГ.13



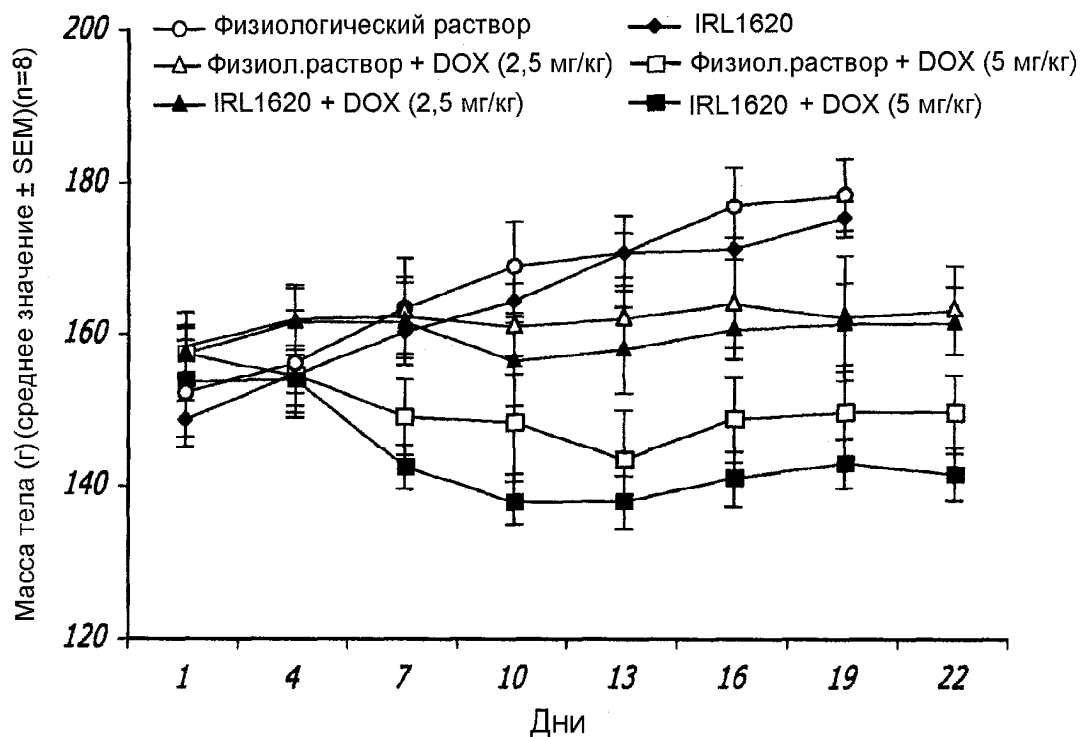
ФИГ.14А



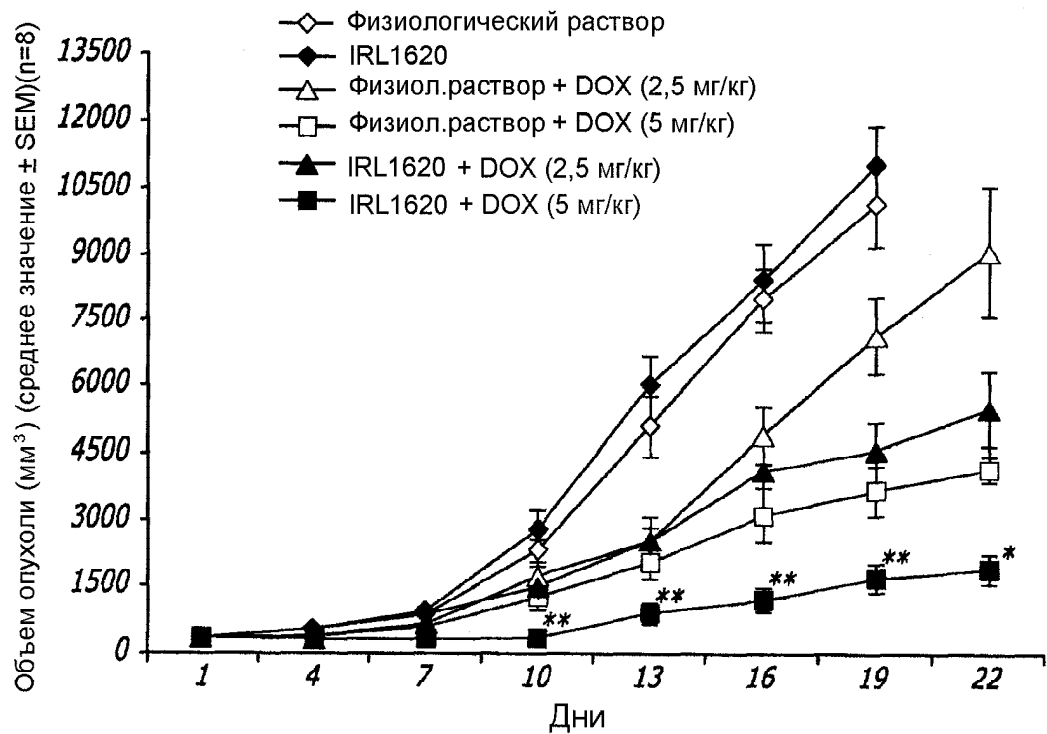
ФИГ.14В



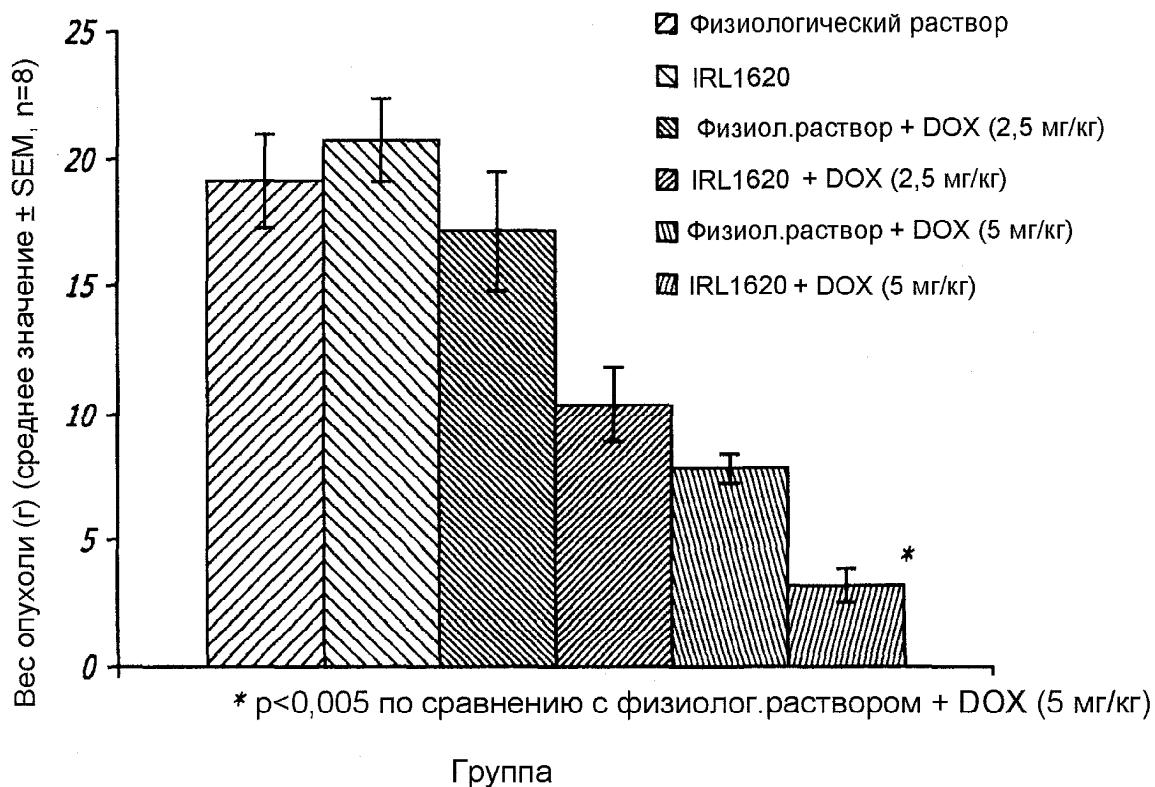
ФИГ.15



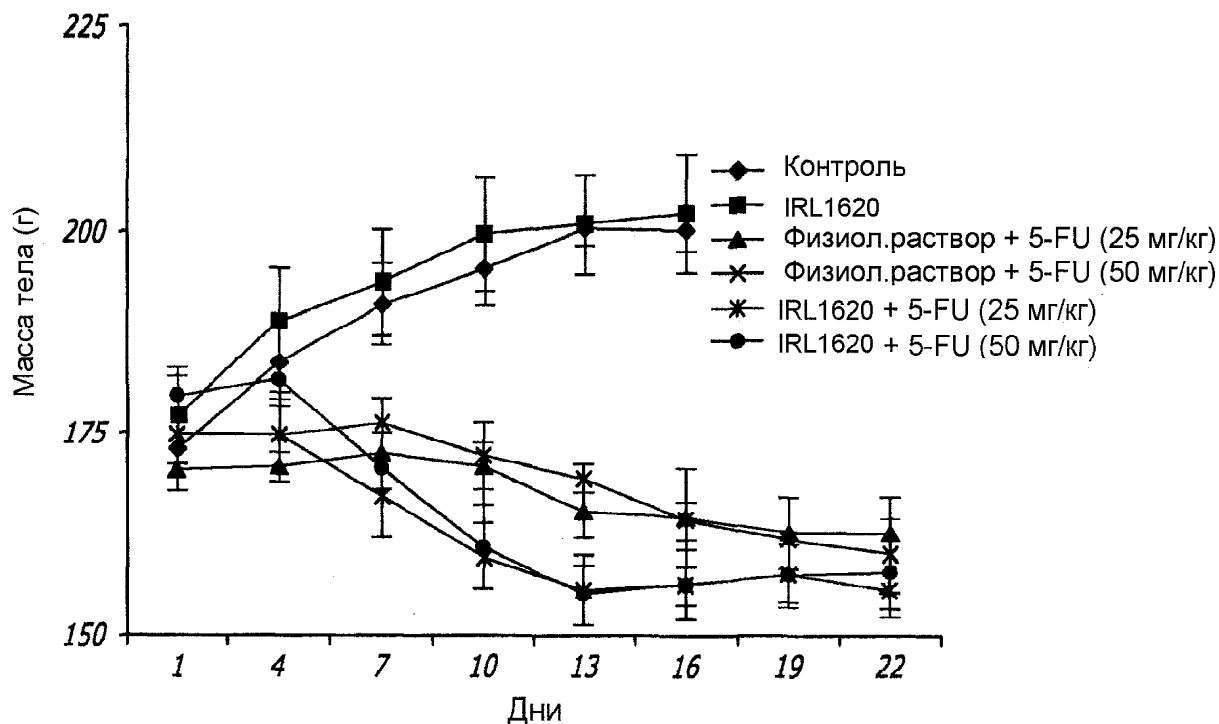
ФИГ.16А



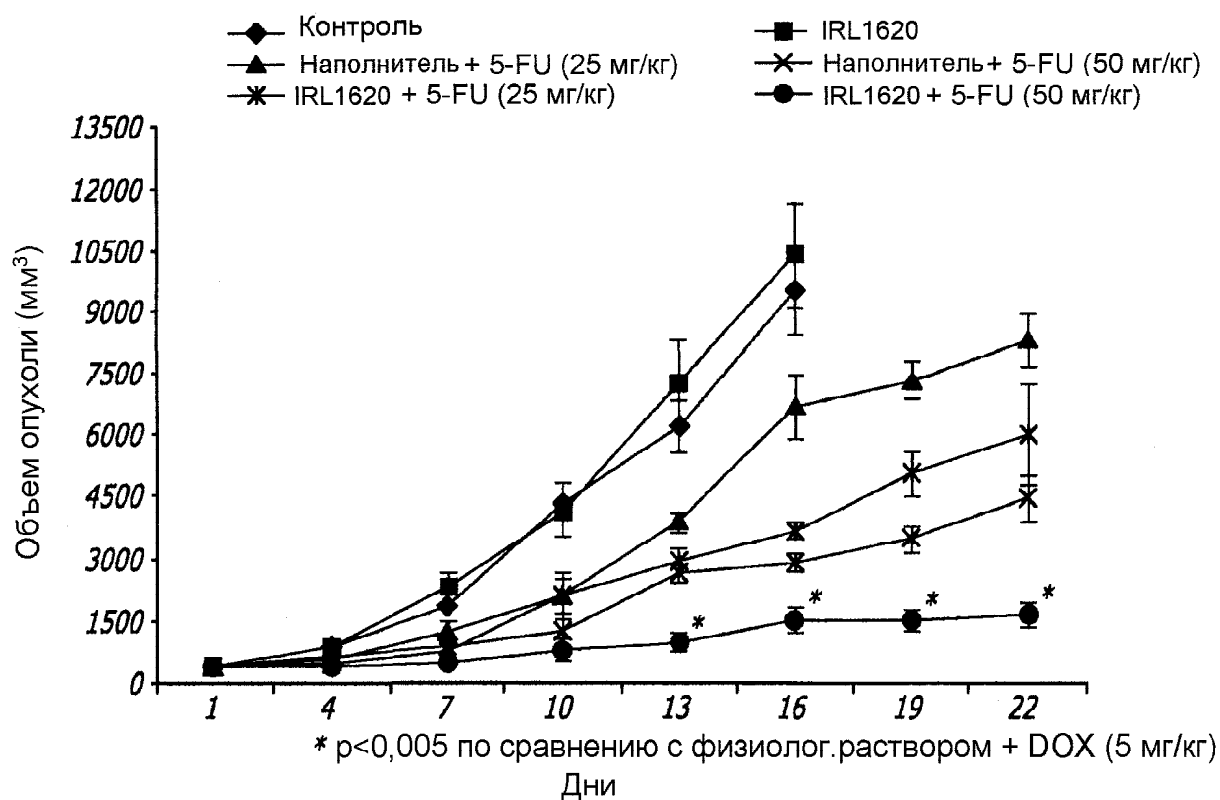
ФИГ.16В



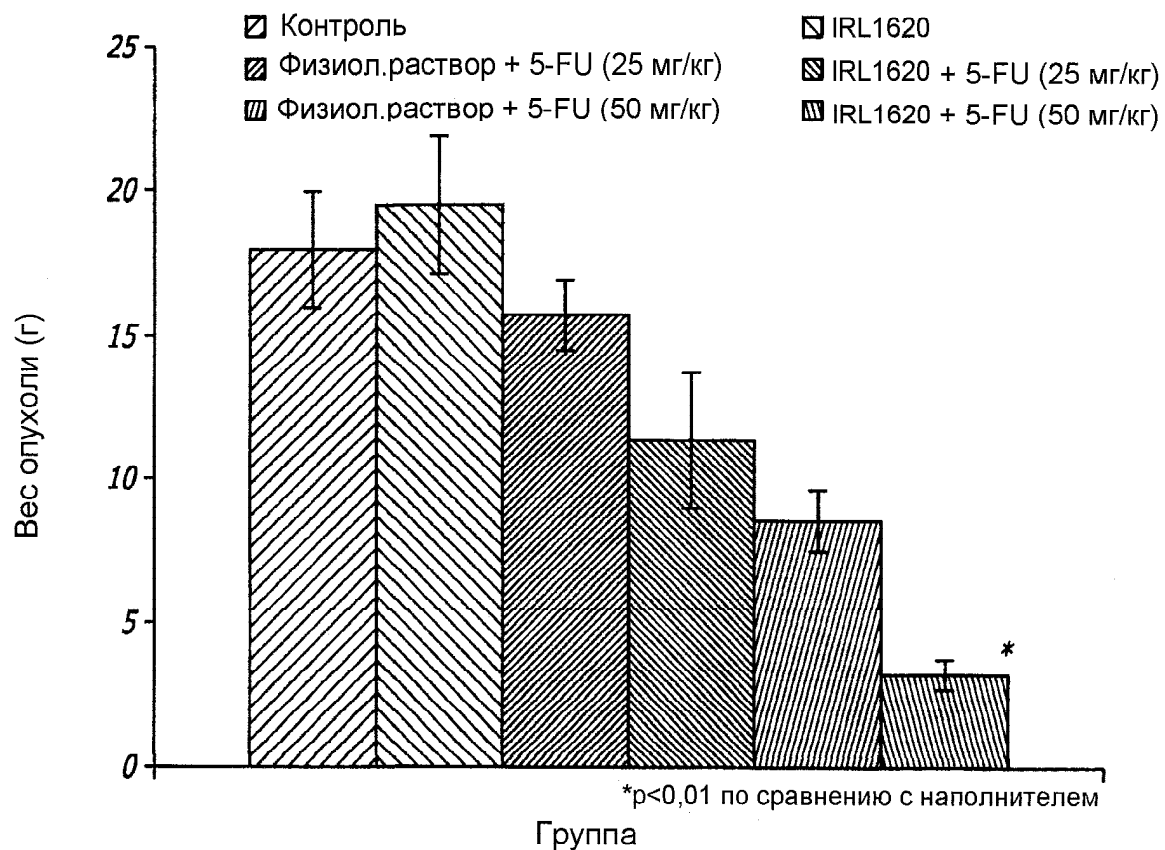
ФИГ.16С



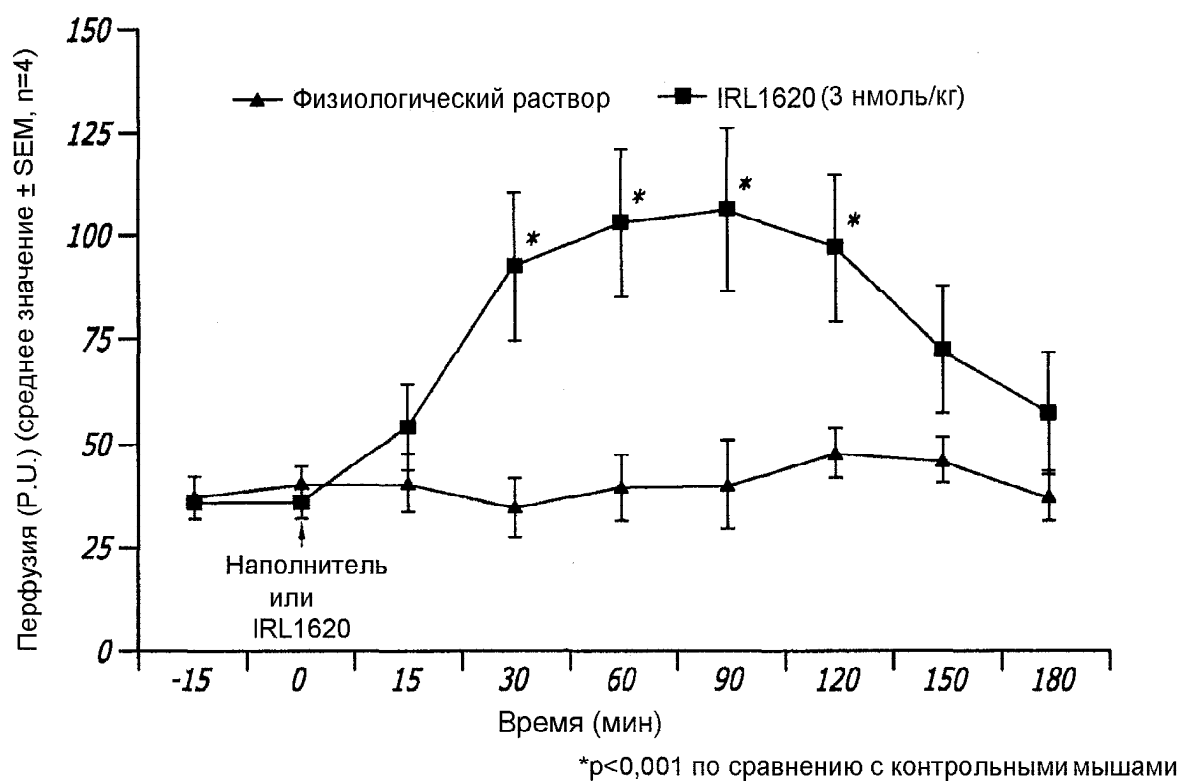
ФИГ.17А



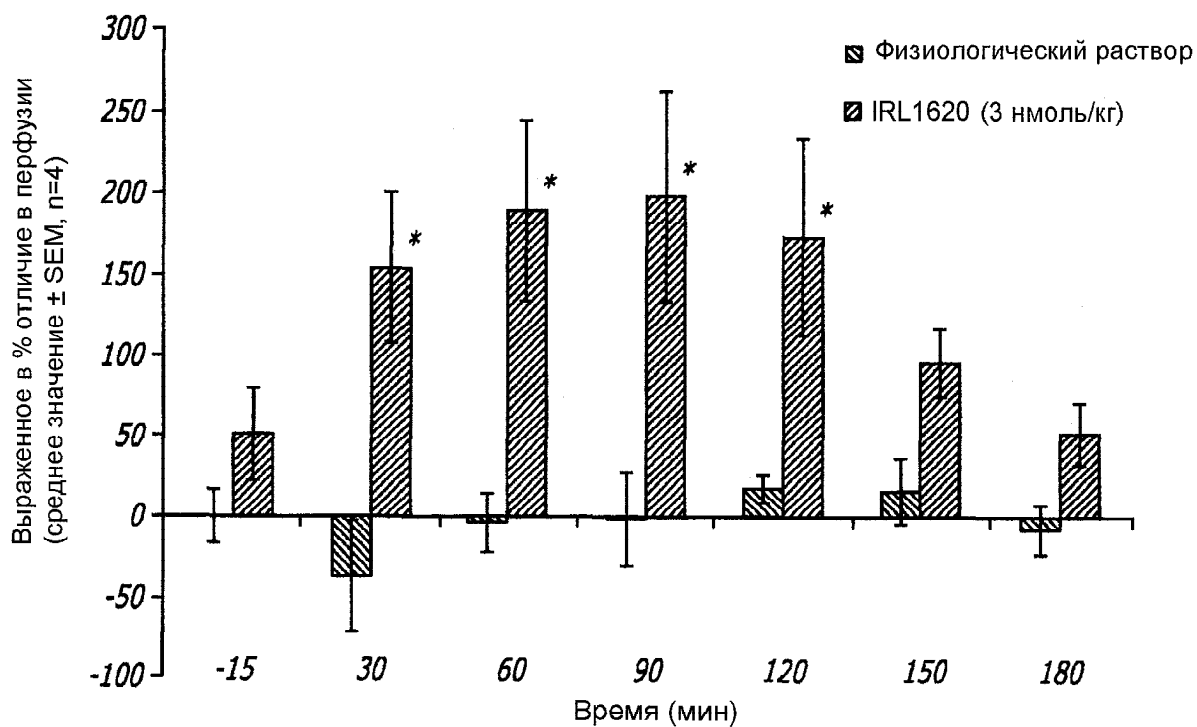
ФИГ.17В



ФИГ.17С

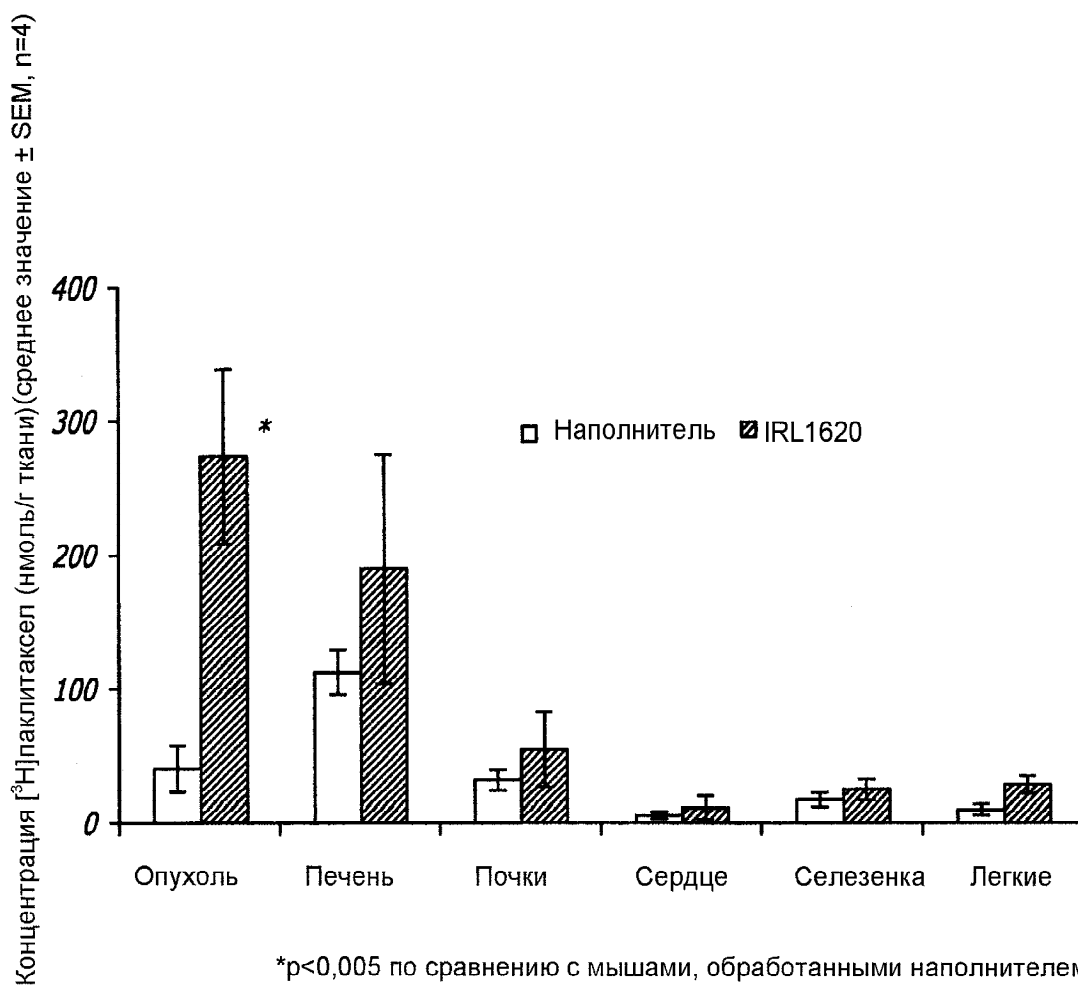


ФИГ.18А



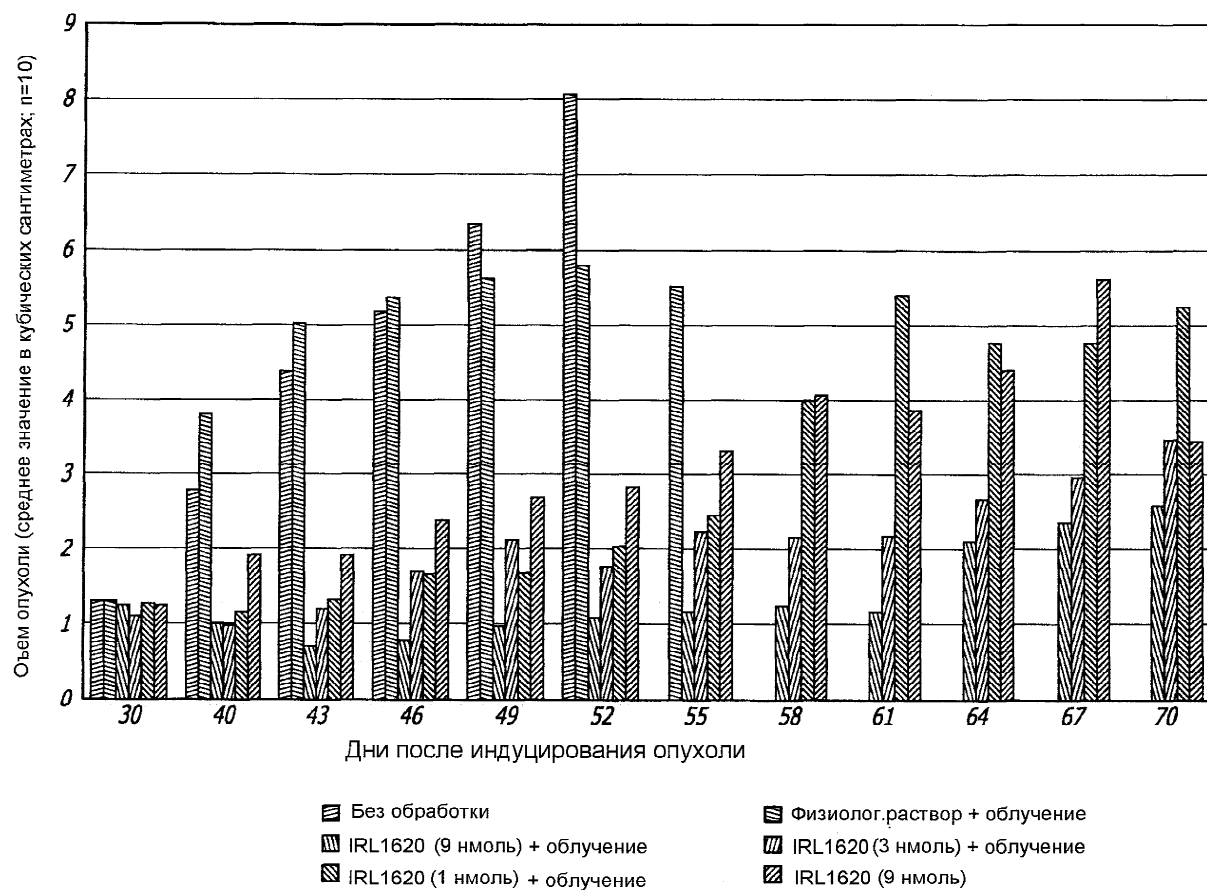
* $p < 0,001$ по сравнению с контрольными мышами

ФИГ.18В



* $p < 0,005$ по сравнению с мышами, обработанными наполнителем

ФИГ.19



ФИГ.20