



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329133**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*A61K 45/06 (2006.01)*

*A61K 31/00 (2006.01)*

*A61K 31/277 (2006.01)*

*A61K 31/352 (2006.01)*

*A61K 31/4545 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

*A61P 35/02 (2006.01)*

*A61P 43/00 (2006.01)*

### Patentstyret

|      |           |            |      |                           |                              |
|------|-----------|------------|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr | 20014897   | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2000.04.06<br>PCT/US00/09124 |
| (22) | Inng.dag  | 2001.10.08 | (85) | Videreføringsdag          | 2001.10.08                   |
| (24) | Løpedag   | 2000.04.06 | (30) | Prioritet                 | 1999.04.09, US, 289255       |
| (41) | Alm.tilgj | 2001.12.10 |      |                           |                              |
| (45) | Meddelt   | 2010.08.30 |      |                           |                              |

|      |            |                                                                                                                                                                          |
|------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (73) | Innehaver  | Schering Corp, 2000 Galloping Hill Road, US-NJ07033-0530 KENILWORTH, USA                                                                                                 |
| (72) | Oppfinner  | Tattanahalli L. Nagabhushan, Parsippany, NJ, US-, USA<br>Walter Robert Bishop, 17 Hopper Avenue, US-NJ07444 POMPTON PLAINS, USA<br>Diana L Brassard, Union, NJ, US-, USA |
| (74) | Fullmektig | Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge                                                                                                          |

|      |                       |                                                                                                                                                                          |
|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) | Benevnelse            | <b>Anvendelse av en FPT-inhibitor ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av kreft i en pasient og for regresjon av tumorvolum i en kreftpasient</b> |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 9745412 A1, WO 9211034 A1                                                                                                                                             |
| (57) | Sammendrag            |                                                                                                                                                                          |

Det tilveiebringes fremgangsmåter for behandling av cancer som omfatter tilførsel av (1) en farnesylproteintransferaseinhibitor sammen med (2) ytterligere en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor for induksjon av cancer- celledød og tumorregresjon.

### Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en FPT-inhibitor ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av kreft i en pasient for regresjon av tumorvolum i en kreftpasient ved administrering av: (1) en inhibitor av farnesylproteintransferase-("FPT") og (2) ytterligere en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor for induksjon av et synergistisk nivå av cancercelledød (særlig apoptotisk celledød), noe som tillater behandlingsskjemaer med lave doser.

### Oppfinnelsens bakgrunn

Figur 1 i den foreliggende beskrivelse viser en forenklet, lineær gjengivelse av en signaloverføringsvei som fører til cellulær proliferasjon. Denne reaksjonsveien betegnes heri "Ras-signalreaksjonsveien" siden Ras er en sentral overfører i denne reaksjonsveien, idet Ras mottar signaler fra oppstrømselementer (f.eks. vekstfaktorreseptorer) og overfører dem til nedstrømselementer.

Signalreaksjonsveiene som utløses av vekstfaktorreseptorer og som fører til cellulær proliferasjon, og i noen tilfeller ondartet transformasjon, er i ferd med å klarlegges. Mange vekstfaktorreseptorer, f.eks. reseptorene for epidermal vekstfaktor (EGF) og blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), så vel som EGF-reseptorbeslektede molekyler (f.eks. Her-2/Neu/ErbB2), besitter en iboende tyrosinkinaseaktivitet som aktiveres ved ligandindusert reseptordimerisering (Heldin, 1995). Dette fører til autofosforylering av reseptoren på tyrosinrester og binding av proteiner som inneholder Src-homologi 2- (SH2) domener. To slike SH2-proteiner er Grb2 og SHC som indirekte aktiverer det plasmamembranassosierte, lille, GTP-bindende protein Ras. Ras-aktivering skjer også som respons på ligandbinding til G-proteinkoblede reseptorer med syv transmembrandomener (f.eks. Gutkind, 1998). Aktivering av Ras-reaksjonsveien og andre vekstfaktorreseptorregulerte signalreaksjonsveier fører til syvende og sist til endringer i cytoskjelettet og genekspresjonen som er nødvendige for cellulær proliferasjon, differensiering og transformasjon (se oversikt i Campbell et al., 1998).

De 3 humane *ras*-genene (Ha-Ras, N-Ras og Ki-Ras) koder for 4 proteiner (grunnet alternativ spleising av Ki-Ras-mRNA). Under normale omstendigheter gjennomgår Ras-proteiner en syklus mellom en aktiv (GTP-bundet) tilstand og en inaktiv (GDP-bundet) tilstand. Ras-aktivering skjer ved utbytting av bundet GDP med GTP, noe som fremmes av en familie med guanin-nukleotidutbyttingsfaktorer. Ras-inaktivering skjer ved hydrolyse av bundet GTP til GDP. Denne reaksjonen fremmes av GTPase-aktiverende proteiner (GAP) (Trahey og McCormick, 1987). I mange humane cancers blir Ras-proteiner onkogen aktivert ved mutasjoner som ødelegger GTPase-aktiviteten og således gir feilregulering av Ras-signaliseringen (se oversikt i Campbell et al., 1998).

Det finnes flere kandidater til Ras-effektorer som kan fungere nedstrøms for Ras i signaloverføringen og den onkogene transformasjon, innbefattet medlemmer av Rho-familien av små GTPaser, fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K) og serin/-treoninproteinkinase c-Raf-1 (se oversikt i Campbell et al., 1998). Raf-formidlet signalisering er den best karakteriserte Ras-effektorreaksjonsvei. Aktivert Ras rekrutterer Raf til membranen hvor Raf-aktivering skjer. Aktivert Raf er den innledende bestanddel av en kinasekaskade, mitogen-aktivert proteinkinase- (MAPK) kaskaden (se oversikt i Lowy og Willumsen, 1993; Campbell et al., 1998). Raf fosforylerer og aktiverer proteinkinase MEK1 og MEK2 (MAPK/ERK-kinase) som i sin tur fosforylerer og aktiverer de ekstracellulære signalregulerte kinaser ERK1 og ERK2 (også betegnet MAPK1 og MAPK2). I motsetning til deres nedstrømsmål, ERK1 og 2, er proteinene MEK1 og 2 svært spesifikke enzymer hvis eneste kjente substrater er proteinene ERK1 og 2. Etter aktivering fosforylerer (og følgelig regulerer) ERK1 og ERK2 en rekke målproteiner, innbefattet nukleære transkripsjonsfaktorer, noe som fører til den endelige cellulære respons. Denne lineære reaksjonsvei for Ras-signalisering er fremstilt skjematisk i figur 1.

Viktigheten av disse signalreaksjonsveiene i den unormale vekst av cancerceller vises ved det funn at vekstfaktorreseptor og Ras-reaksjonsbestanddeler ofte er muterte og/eller overuttrykte i cancer. For eksempel er Ras aktivert

ved mutasjon i tilnærmet 30% av humane cancere innbefattet en høy prosentandel av de viktigste epitelcancer, f.eks. lungecancer, coloncancer og bukspyttkjertelcancer. I tillegg opptrer overekspresjon av vekstfaktorreseptorer i en rekke cancere (f.eks. opptrer overekspresjon av Her-2/Neu-reseptoren i tilnærmet 30% av humane brystcancer). Disse observasjonene har ført til søk etter og utvikling av midler utformet for blokkering av enkeltbestanddeler i en av signaloverføringsreaksjonsveiene. Selv om slike midler har potensial som nye, terapeutiske cancermidler, antas mange inhibitorer av signaloverføringen å fungere på en cytostatisk snarere enn cytotoxisk måte ved at cellens progresjon gjennom celledødsprosessen blokkeres. Dette skiller dem fra tradisjonelle kjemoterapeutiske cancermidler ved at de er mindre toksiske, men at de også besitter mindre dramatisk antitumoraktivitet.

WO 9745412, D1, vedrører en metode for behandling av kreft som går ut på at det administreres til en pasient en forbindelse som inhiberer MEK og en forbindelse som inhiberer farnesylproteintransferase. MEK-inhibitoren kan være Ras-signalreaksjonsveihinhibitoren PD 098059.

WO9211034, D2, gjør kjent potensiellende midler som øker effektiviteten til antineoplastiske midler. Sammendraget i D2 nevner terfenadin, loratadin og astemizol som er trisykliske benzosykloheptapyridiner med kondenserte ringer.

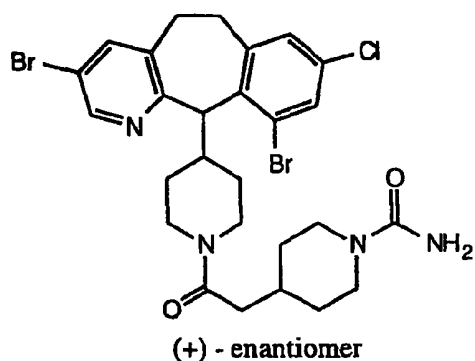
Anvendelse av en FPT-inhibitor i kombinasjon med en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor der FPT-inhibitoren er bestemt angitt som et trisyklisk benzosykloheptapyridin er ny.

Det tekniske problemet som løses ved den foreliggende oppfinnelse er å bringe til veie forbedrede preparater for behandling av cancer ved selektiv induksjon av cancercelledød. Det er også et formål med oppfinnelsen at preparatet gir minimale toksiske bivirkninger mot normale, ikke-transformerte celler.

### Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en FPT-inhibitor ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av kreft i en pasient **tilnærmet** ved administrering

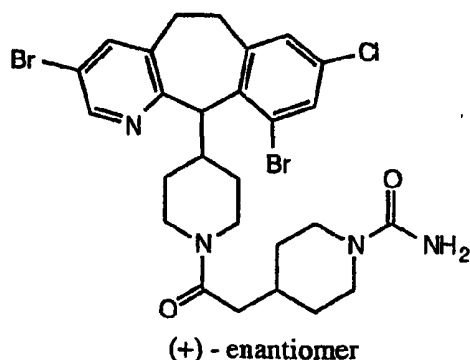
(1) en FPT-inhibitor av følgende formel



og (2) en ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor, i mengder som er effektive til å fremkalle et synergistisk nivå av kreftcelledød. Det fremkalles derved en uventet dramatisk induksjon av kreftcelledød (særlig apoptotisk celledød). Virkningene er synergistiske og sterkt selektive for transformerte celler (særlig tumorigene cancerceller), noe som tillater anvendelse av lave doser for minimalisering av mulige toksiske bivirkninger mot normale, ikke-transformerte celler. Videre ble det overraskende funnet å gi en langvarig, vedvarende virkning når det gjelder blokkering av celledesignaleringen, fortsatt med en minimalisering av mulige toksiske bivirkninger mot normale, ikke-transformerte celler. Ingen av disse virkningene, og heller ikke styrken av dem, kunne forutsis før foreliggende oppfinnelse. Ved at det dras fordel av den overraskende synergi og de vedvarende, langvarige virkningene tilveiebringes videre spesielle lavdosemetoder slik at cancercelledød oppnås effektivt samtidig som en lav risiko for mulige toksiske bivirkninger på normale, ikke-transformerte celler bibeholdes. Disse er spesielt anvendbare for behandling av forskjellige tumorigene cancere, særlig epiteliale cancere (f.eks. bukspyttkjertelcancer, ovarie-cancer, prostatacancer, lungecancer, brystcancer, colorektal cancer og urinblærecancer), og melanom.

### Kort beskrivelse av figurene

Den FPT-inhiberende forbindelse som det refereres til i figurene 1 til 7 (noen ganger betegnet "SCH 66336"), er som følger:



**Figur 1: Ras-signaloverføring:** Skjematisk fremstilling av bestanddelene i Ras/MAPK-signaloverføringsveien. Denne lineære reaksjonsvei fra vekstfaktorreseptor til ERK-aktivering var den første Ras-formidlede reaksjonsvei som ble oppklart. Også angitt er trinn som forskjellige inhibitorer er rettet mot, innbefattet FPT-inhibitoren SCH 66336 og MEK-inhibitorene PD098059 og U0126.

**Figur 2: Den doseavhengige, apoptotiske respons på behandling med PD098059 forsterkes ved tilsetning av SCH 66336:**

H-Ras-CVLS-transformerte Rat2-celler ble behandlet i 36 timer med de angitte konsentrasjoner av PD098059 (A385-023-M005; Alexis Corporation), enten alene eller i kombinasjon med SCH 66336. Cellene ble høstet ved behandling med trypsin/EDTA, fiksert i aceton/metanol (50%:50%) ved -20 °C i 30 minutter, vasket grundig med PBS og merket i 30 minutter ved romtemperatur med PBS tilsatt 75 µg/ml propidiumjodid (PI; Calbiochem; La Jolla, CA), og 500 µg/ml RNase (Sigma; St. Louis, MO). Apoptose ble målt ved propidiumjodidfarging av kromosomalt DNA og FACS-analyse av cellepopulasjonen (FACS-Calibur, Becton-Dickinson; Mountain View, CA). Konsentrasjonen av PD098059 ble variert fra 0,25 til 20 µM i nærvær (▲) eller fravær (■) av 100 nM SCH 66336.

**Figur 3: Den doseavhengige, apoptotiske respons på behandling med SCH 66336 forsterkes ved tilsetning av PD098059:**

H-Ras-CVLS-transformerte Rat2-celler ble behandlet i 36 timer

med de angitte konsentrasjoner av SCH 66336, enten alene eller i kombinasjon med PD098059. Analysen ble utført som beskrevet i beskrivelsen for figur 2 ovenfor. Konsentrasjonen av SCH 66336 ble variert fra 0,0125 til 0,75  $\mu\text{M}$  i nærvær ( $\blacktriangle$ ) eller fravær ( $\blacksquare$ ) av 2,5  $\mu\text{M}$  PD098059.

**Figur 4: Virkning av SCH 66336 og U0126 på apoptose**

**målt ved FACS:** H-Ras-transformerte Rat2-celler ble behandlet i 24 timer med 0 til 10  $\mu\text{M}$  U0126 (nr. V1121; Promega Corporation; Madison, WI) i nærvær eller fravær av 0,5  $\mu\text{M}$  SCH 66336. Analysen ble utført som beskrevet i underteksten til fig. 2. 1 = ubehandlede celler, 2 = SCH 66336, 3 = 1  $\mu\text{M}$  U0126, 4 = 1  $\mu\text{M}$  U0126 + SCH 66336, 5 = 5  $\mu\text{M}$  U0126, 6 = 5  $\mu\text{M}$  U0126 + SCH 66336, 7 = 10  $\mu\text{M}$  U0126, 8 = 10  $\mu\text{M}$  U0126 + SCH 66336.

**Figur 5: Virkning av SCH 66336 og PD098059 på apoptose**

**målt ved caspaseaktivering:** H-Ras-transformerte Rat2-celler og parenterale Rat2-celler ble behandlet i 24 timer med 20  $\mu\text{M}$  PD098059, 0,5  $\mu\text{M}$  SCH 66336, eller en kombinasjon av de to medikamenter. Cellene ble lysert i en detergentbuffer anbefalt av Clontech (Apo-Alert CPP32/Caspase-3-analyse) og sentrifugert ved 14 000 rpm i 15 minutter ved 4 °C for nedsentrifugering av cellerester. Proteinkonsentrasjonen i den resulterende supernatant ble bestemt ved en BCA-proteinanalyse (Pierce; Rockford, IL) med 175  $\mu\text{g}$  av hvert lysat analysert for Caspase-3-aktivitet ved anvendelse av et fluorogent peptidsubstrat (AC-DEVD-AMC; Clontech; Palo Alto, CA) ved fluorometri (CytoFluor plateleser; Perseptive Biosystems; Framingham, MA). 1 = ubehandlede H-ras-celler, 2 = H-ras-celler + SCH 66336, 3 = H-ras-celler + PD09059, 4 = H-ras-celler + SCH 66336 + PD 098959, 5 = ubehandlede Rat2-celler, 6 = Rat2-celler + SCH 66336, 7 = Rat2-celler + PD09059, 8 = Rat2-celler + SCH 66336 + PD 098959.

**Figur 6: Virkning av SCH 66336 og PD098059 på fosforylering av ERK1 og ERK2:**

H-Ras-transformerte Rat2-celler ble behandlet med 20  $\mu\text{M}$  PD098059 eller 0,5  $\mu\text{M}$  SCH 66336 i fra 0 til 36 timer. Cellene ble lysert i en detergentbuffer og sentrifugert ved 14 000 rpm i 15 minutter ved 4 °C for nedsentrifugering av cellerester. Proteinkonsentrasjonen i den resulterende supernatant ble bestemt ved en BCA-proteinanalyse (Pierce; Rockford, IL). Cellulære proteiner (20  $\mu\text{g}$ ) fra fraksjonert ved 8-16% Tris-glysin-polyakrylamidgelelektroforese

(Novex; San Diego, CA). Proteinene ble så overført til PVDF-membraner for Western-blot-analyse. Fosforylert ERK1 og ERK2 ble påvist ved anvendelse av et polyklonalt kaninantistoff spesifikt for de fosforylerte proteinene p42/44 MAPK (fosfo-Thr202/Tyr204-spesifikt; nr. 9101; New England Biolabs, Inc.; Beverly MA). Totalmengden av ERK1 og ERK2 ble påvist ved anvendelse av et polyklonalt kaninantistoff spesifikt for proteinene p42/44 MAPK (nr. 9102; New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA). Begge antistoffer ble gjenkjent av anti-muse-HRP-antistoff fra geit (pepperrotperoksidase; Chemicon; Temecula, CA) og synliggjort ved forsterket kjemiluminescens (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce, Rockford, IL).

#### **Figur 7: Intracellulære**

**signaloverføringsreaksjonsveier:** Figur 1 viste en lineær reaksjonsvei som fører fra vekstfaktorreseptorer via Ras til aktivering av MAPK-kaskaden. Det er klart at signalreaksjonsveier er tydelig mer kompliserte, med flere grener og tverrforbindelser. Noe av denne kompleksitet er illustrert her i figur 7.

#### Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en FPT-inhibitor ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av kreft i en pasient for regresjon av tumorvolum i en kreftpasient ved administrering av (1) en inhibitor av farnesylproteintransferase-(FPT) og (2) ytterligere en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor.

(1) En "farnesylproteintransferaseinhibitor" eller "FPT-inhibitor" eller "FTI" er definert heri som en forbindelse som: (i) gir kraftig inhibering av FPT (men fortrinnsvis ikke geranylgeranylproteintransferase I, *in vitro*), (ii) blokkerer den fenotypiske endring som induseres av en form for transformerende H-ras som er en farnesylakseptor (men fortrinnsvis ikke av en form av transformerende H-ras som er modifisert slik at den er en geranylgeranylakseptor), (iii) blokkerer den intracellulære farnesylering av ras, og (iv) blokkerer unormal cellevekst.

(2) En "Ras-signalreaksjonsveihinhibitor" defineres heri som et middel som blokkerer aktiviteten av ethvert protein



i signaloverføringsveien vist i fig. 1. En spesielt foretrukket Ras-signalreaksjonsveihinhibitor er en "MEK-inhibitor" som er definert heri som et middel som blokkerer *in vitro*-enzymaktiviteten av et MEK- (MAPK/ERK-kinase) protein (fortrinnsvis inhibering av MEK1 og MEK2), og således blokkerer aktiveringen av et MAPK-protein som vist ved en blokkering av fosforyleringen av MAPK-proteinet. Dette kan påvises ved western-blot-analyse av fosforylert MAPK som f.eks. beskrevet i Dudley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7686-7689 (1995), og Favata et al., J. Biol. Chem. 273:18623-32 (1998).

#### 1. FPT-inhibitorer

Som midler benyttet alene eller i kombinasjon med kjemoterapeutiske midler (se f.eks. Liu et al., 1998), representerer FPT-inhibitorer en ledende tilnærming for blokkering av funksjonen av Ras-onkoproteiner. FPT katalyserer kobling av en isoprenyllipidgruppe til en cysteinrest som foreligger nær Ras-proteinets karboksyende. Dette er første trinn i en reaksjonsvei for posttranslasjonell prosessering som er avgjørende både for membranassosiering av Ras og Ras-inudusert onkogen transformasjon. En rekke FPT-inhibitorer er blitt rapportert, innbefattet flere peptidetterlignende inhibitorer så vel som andre lavmolekylære inhibitorer, mest bemerkelsesverdig de trisykliske FPT-inhibitorene som SCH 66336 er et eksempel på. FPT-inhibitorer interfererer med den posttranslasjonelle prosessering av Ras-proteiner i celler og viser antitumoraktivitet i et bredt utvalg av *in vitro*- og *in vivo*-cancermodeller (Bishop et al., 1995; Liu et al., 1998). Antitumoraktiviteten av SCH 66336 innbefatter inhibering av forankringsuavhengig vekst av en rekke humane tumorcellelinjer *in vitro*, og vekst av disse som xenotransplantater i immunkompromitterte mus (Liu et al., 1998). Humane tumorcellelinjer viser signifikante forskjeller innbyrdes når det gjelder sensitivitet overfor vekstvirkningene av FPT-inhibitorer. Sensitivitet eller resistens korrelerer ikke med mutasjonsstatusen til Ras.

I flere transgene musetumormodeller (f.eks. MMTV-H-Ras, WAP-H-Ras, TGF $\alpha$  og TGF $\alpha$ /neu) induseres signifikante tumorregresjoner ved behandling med FPT-inhibitorer. Disse

regresjonene er forbundet med økt apoptose (Liu et al., 1998; Barrington et al., 1998; Norgaard et al., 1999). FPT-inhibitorer kan også indusere apoptose av transformerte celler i kultur. Den apoptotiske virkning in vitro er blitt rapportert å kreve vekst  
5 i medium med lav serumkonsentrasjon eller tvungen vekst i suspensjon (Hung og Chaung, 1998; Lebowitz et al., 1997; Suzuki et al., 1998).

Det er også blitt vist at FPT-inhibitorbehandling reduserer aktiviteten av MAPK-reaksjonsveien i Ha-Ras-transformerte Rat1-celler (se f.eks. James et al., 1994). Denne  
10 reduserte MAPK-aktivitet korrelerer med redusert cellevekst. FPT-inhibitorer reduserte ikke MAPK-aktiviteten i ikke-transformerte Rat1-celler.

## 15 2. Midler rettet mot MEK

MAPK-reaksjonsveien er også blitt undersøkt som et mål for utvikling av terapeutiske anti-cancermidler, og virkningene av forskjellige inhibitorer av denne reaksjonsveien på  
20 tumorcellelinjer er blitt beskrevet (Dudley et al., 1995; Favata et al., 1998). Den best karakteriserte MEK-inhibitor er PD098059, et lite molekyl som inhiberer aktiviteten av MEK1 og MEK2 ved direkte binding på en måte som er ikke-konkurrerende for begge substrater (ATP og ERK-protein). Dette fører til  
25 redusert fosforylering av MEK1- og MEK2-fosforylering og redusert aktivering av MEK-substratene, ERK1 og ERK2. PD098059-behandling blokkerer vekstfaktorformidlet proliferasjon og forankringsuavhengig vekst av Ras-transformerte celler (Alessi et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:27489-27494).

Det ble nylig beskrevet en ny MEK-inhibitor, U0126,  
30 som bindes til MEK med høyere affinitet enn PD098059 (Favata et al., 1998). For en mer detaljert informasjon vedrørende MEK-inhibitorer og fremgangsmåter for fremstilling av MEK-inhibitorer, kan det f.eks. vises til de internasjonale patentskriftene WO 99/01421 (14. januar 1999) og WO 99/01426  
35 (14. januar 1999).

## 3. Midler rettet mot vekstfaktorreseptorer

To primære tilnærminger er blitt benyttet for blokkering av vekstfaktorreseptor-signalreaksjonsveier: (i)

monoklonale antistoffer rettet mot reseptoren, (ii) inhibitorer av reseptorens tyrosinkinaseaktivitet, og (iii) "antisense"-nukleinsyrer som blokkerer proteinekspresjonen. Monoklonale anti-reseptorantistoffer omfatter antistoffer rettet mot erbB2-reseptoren (f.eks. Genentechs "HERCEPTIN"/trastuzumab) og antistoffer rettet mot EGF-reseptoren. Det best karakteriserte anti-EGF-reseptorantistoff er det kimære antistoff C225 (Goldstein et al. (1995), Clin. Cancer Res. 1:1311-1318). Både "HERCEPTIN" og C225 har vist aktivitet i prekliniske tumormodeller i hvilke de tilhørende reseptorer uttrykkes.

Lavmolekylære inhibitorer av tyrosinkinaseaktivitet er også blitt rapportert hvor minst to av disse forbindelsene allerede gjennomgår kliniske forsøk i mennesker: Sugens PDGF-reseptorinhibitor SU101, som er i kliniske fase III-forsøk for gliom og forsøk i tidligere faser for andre cancere, og Pfizers EGF-reseptorinhibitor CP-358 774, som er i kliniske forsøk i tidlige faser (Moyer et al. (1997), Cancer Res. 57:4838-4848).

#### 4. Andre signalantagonister

I tillegg til tilnærmingene beskrevet ovenfor, har andre bestanddeler av Ras-signalreaksjonsveien og andre signal-overføringsveier vært mål for søk etter cancermedikamenter. SH2-proteinene (SHC og Grb2) som kobler vekstfaktorreseptorer til Ras-aktivering, har vært målet for peptidetterlignende midler som blokkerer binding av SH2-domener til fosfotyrosinholdige proteinsekvenser.

Proteinkinasen Raf som kobler Ras til aktivering av MEK1 og 2, har også vært målet for lavmolekylære kinase-inhibitorer og "antisense"-tilnærminger. Denne siste tilnærming (ISIS-5132) er i kliniske fase II-forsøk (Monia et al., 1996).

Andre relevante, intracellulære signalmål omfatter fosfolipidkinasen PI3K (fosfatidylinositol-3-kinase) og protein-kinase C.

I foretrukne utførelser kan metoder anvendes for behandling av tumorigene cancerceller ved at de har en signifikant virkning på celledød (f.eks. ved apoptose) når det gjelder cancercellene (dvs. at de har en signifikant virkning på celledød ut over en ren stans av veksten), samtidig som de aktive midler kan tilføres i relativt lave doser (og/eller

mindre hyppig) for minimalisering av mulige toksiske bivirkninger mot normale, ikke-transformerte celler. I tillegg tilveiebringes det nye metoder for behandling av cancer ved at de gir en mer langvarig, vedvarende virkning når det gjelder  
 5 blokkering av cellesignalisering, samtidig som faren for mulige toksiske bivirkninger på normale celler minimaliseres.

Det tilveiebringes også metoder for induksjon av et synergistisk nivå av cancercelledød (f.eks. apoptose) i en cancerpasient som omfatter tilførsel, samtidig eller  
 10 sekvensielt, av effektive mengder av (1) en FPT-inhibitor og (2) en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor (dvs. i mengder som er tilstrekkelig til at det induseres et synergistisk nivå av cancercelledød, f.eks. målt ved propidiumjodid-fluorescens-  
 analysen beskrevet i Dengler et al., (1995), Anticancer Drugs,  
 15 6:522-32. Samtidig tilveiebringes metoder for dreping av cancer-celler i en cancerpasient (målt ved analysen til Dengler et al. 1995) som omfatter tilførsel av effektive mengder av (1) en FPT-inhibitor og (2) ytterligere en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor.

Foretrukne utførelser for behandling av tumorer og  
 20 regresjon av tumorvolumet (f.eks. målt ved et CAT-scan) i en pasient med behov for slik behandling (f.eks. et pattedyr som et menneske) omfatter tilførsel, samtidig eller sekvensielt, av (1) en FPT-inhibitor og (2) ytterligere en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor i mengder som er tilstrekkelig til at dette oppnås.  
 25 Eksempler på tumorer som kan behandles, omfatter epitelcancere, f.eks. prostatacancer, lungecancer (f.eks. lungeadenokarsinom), f.eks. bukspyttkjertelcancere (f.eks. bukspyttkjertelkarsinom som f.eks. eksokrint bukspyttkjertelkarsinom), brystcancere, coloncancere (f.eks. colorektale karsinomer som f.eks.  
 30 colonadenokarsinom og colonadenom), ovariecancer, urinblære-karsinom og levercancere. Andre cancere som kan behandles, omfatter melanom, myeloide leukemier (f.eks. akutt myelogen leukemi), sarkomer, follikulær tyreoidcancer og myelo-dysplastisk syndrom.

35 Farmasøytiske preparater omfatter en FPT-inhibitor og en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor for behandling av cancer (innbefattet induksjon av cancercelledød og tumorregresjon).

Som anvendt heri, har de påfølgende begreper den angitte betydning dersom ikke annet er angitt:

"Vekstfaktorreseptorinhibitor": et middel som blokkerer en vekstfaktorreseptors signaloverføringsegenskaper. Disse kan fungere som direkte inhibitorer av reseptorens tyrosinkinaseaktivitet eller ved å inhibere ligandstimulert  
 5 aktivering av reseptorens kinaseaktivitet som beskrevet i Levitzki og Gazit, 1995 (Science, 267:1782-1788).

"Tyrosinkinaseinhibitor": et middel som blokkerer tyrosinfosforyleringsaktiviteten, enten ved at den konkurrerer med ATP eller via en allosterisk interaksjon med enzymet, som  
 10 beskrevet i Levitzki og Gazit, 1995.

"Proteinkinaseinhibitor": et middel som blokkerer proteinfosforyleringsaktivitet på serin-, treonin- eller tyrosinrester som beskrevet i Levitzki og Gazit, 1995.

"p185 erbB2/HER2/neu-reseptorinhibitor" eller "erbB2-reseptorinhibitor": et middel som blokkerer erbB2-reseptorens signaloverføringsegenskaper, enten ved å inhibere reseptorens tyrosinkinaseaktivitet eller ved å blokkere ligandstimulering av reseptorens kinaseaktivitet, som beskrevet i Levitzki og Gazit,  
 15 1995.

"PDGF-reseptortyrosinkinaseinhibitor": et middel som blokkerer blodplateavledet vekstfaktor- (PDGF) reseptorens signaloverføringsegenskaper, enten ved å inhibere reseptorens tyrosinkinaseaktivitet eller ved å blokkere PDGF-stimulering av reseptorens kinaseaktivitet som beskrevet i Kovalenko, M. et al.  
 20 (1994). Cancer Res. 54:6106-6114.

"EGF-reseptortyrosinkinaseinhibitor": et middel som blokkerer epidermal vekstfaktor- (EGF) reseptorens signaloverføringsegenskaper, enten ved å blokkere reseptorens tyrosinkinaseaktivitet eller ved å blokkere EGF-stimulering av  
 30 reseptorens kinaseaktivitet som beskrevet i Fry et al. (1994), Science 9:1093-1095.

"Et antistoff rettet mot en vekstfaktorreseptors ekstracellulære domene": et slikt antistoff blokkerer vekstfaktorreseptorens biologiske aktivitet ved å inhibere  
 35 binding av ligand og/eller forhindre ligandstimulert aktivering av reseptorens tyrosinkinase som beskrevet i Mendelsohn, J. (1992), J. Nat'l. Cancer Inst. Monogr. 13:125-131.

"Et monoklonalt antistoff rettet mot erbB2/HER2/neu-reseptoren p185" eller "Et monoklonalt antistoff rettet mot

erbB2-reseptoren": et slikt antistoff blokkerer HER2-reseptorens biologiske aktivitet ved inhibering av binding av ligand og/eller forhindring av ligandstimulert aktivering av vekstfaktorreseptorens kinase som beskrevet i Pegram et al., 1998; se også Carter et al. (1992), Proc. Nat'l. Acad. Sci. 89:4285-4289.

"Et monoklonalt antistoff rettet mot EGF-reseptoren": et monoklonalt antistoff som inhiberer EGF-binding og/eller EGF-stimulert kinaseaktivitet som beskrevet i Mendelsohn, J. (1992), J. Nat'l. Cancer Inst. Monogr. 13:125-131.

"Et "antisense"-molekyl rettet mot en vekstfaktorreseptor eller en annen deltaker i Ras-signalreaksjonsveien": et modifisert oligonukleotid som interfererer med budbringer-RNA-translasjonen (og således proteinekspresjonen) for enhver proteindeltaker i reaksjonsveien som beskrevet i Wang et al., 1998 eller Resnicoff, 1998. For en generell diskusjon vedrørende "antisense"-teknologi, se f.eks. Antisense DNA and RNA (Cold Spring Harbor Laboratory, D. Melton, red., 1988).

"Samtidig": (1) samtidig i tid, eller (2) på forskjellige tidspunkter i løpet av et felles behandlingsskjema, og

"Sekvensielt": (1) tilførsel av én bestanddel av fremgangsmåten ((a) FPT-inhibitor eller (b) en ytterligere Ras-reaksjonsveihinhibitor) fulgt av tilførsel av den andre bestanddel, etter tilførsel av én bestanddel kan den andre bestanddel tilføres i det vesentlige umiddelbart etter den første bestanddel, eller den andre bestanddel kan tilføres etter et effektivt tidsrom etter den første bestanddel hvor det effektive tidsrom er en mengde tid som gis for å oppnå maksimal virkning av tilførsel av den første bestanddel.

"Nedstrøms" er definert heri som en proteinaktivitet (i Ras-signalreaksjonsveien) som reguleres av Ras, enten direkte via protein:proteinbinding eller indirekte via et Ras-regulert effektorprotein. Med henvisning til figur 1 kan således et "element nedstrøms for Ras" f.eks. være Mek1,2 eller Erk1,2.

"Oppstrøms" er definert heri som en proteinaktivitet (i Ras-signalreaksjonsveien) som vil regulere aktiviteten av Ras, enten direkte via protein:proteinbinding eller indirekte ved regulering av et annet protein som direkte bindes til og

regulerer aktiviteten av Ras. Et "element oppstrøms for Ras" kan således være f.eks. erbB2, PDGF-reseptor, IGF-reseptor eller EGF-reseptor.

"Celledød" som beskrevet heri, er død av en celle induisert enten under fysiologiske betingelser eller ved akutt skade, noe som fører til nedbrytning av celleorganellene og cellens proteiner og opphør av metabolske prosesser som beskrevet i en oversikt i Raff, M. (1998). Nature 396:119-122. Celledød kan f.eks. måles ved propidiumjodid-"flow"-cytometrianalyse som beskrevet i Dengler et al., (1995) Anticancer Drugs 6:522-32.

"Apoptose" som beskrevet heri som en form for celledød (programmert celledød) som viser stereotypiske, morfologiske endringer som beskrevet i en oversikt i Raff, M. (1998). Nature 396:119-122. Apoptose kan f.eks. måles ved propidiumjodid-"flow"-cytometrisk analyse som beskrevet i Dengler et al., (1995) Anticancer Drugs 6:522-32, eller ved *in situ* terminal deoksynukleotidyltransferase- og "nick"-translasjonsanalysen (TUNEL-analysen) som beskrevet i Gorczyca, (1993) Cancer Res. 53:1945-51.

"Synergistisk" eller "synergistisk nivå" er definert heri som en virkning oppnådd ved kombinasjon av to bestanddeler som er større enn summen av virkningen av hver av de to bestanddeler alene (mens mengden bestanddel holdes konstant). Således viser f.eks. begrepet "mengder som effektivt induserer et synergistisk nivå av cancercelledød" til mengder av to bestanddeler som gir et nivå av cancercelledød (f.eks. celledød ved apoptose målt ved propidiumjodid-"flow"-cytometrisk analyse som beskrevet i Dengler et al., (1995) Anticancer Drugs 6:522-32, eller ved *in situ* terminal deoksynukleotidyltransferase- og "nick"-translasjonsanalysen (TUNEL-analysen) som beskrevet i Gorczyca, (1993) Cancer Res. 53:1945-51), som er større enn summen av virkningen av de to bestanddelene hver for seg.

"Vedvarende virkning" er definert heri som en forlenget/forsterket apoptotisk respons på kombinasjonsbehandling med en FPT I-inhibitor og en MEK1,2-inhibitor sammenlignet med behandling med én inhibitor alene. Følgene av en "vedvarende virkning" kan måles enten ved måling av MAPK-aktivitet, celledød eller apoptose som beskrevet heri tidligere. Det effektive

tidsforløp for inhibering av MAPK-reaksjonsveien av medikamentene enkeltvis er doseavhengig. Eksperimentene heri viser imidlertid at MEK1,2-inhibitorene gir optimal inhibering av MAPK-reaksjonsveien etter 6 timers behandling eller  
 5 tidligere, mens SCH 66336 viser optimal MAPK-reaksjons-veiinhibering 12-18 timer etter behandlingen. Den MAPK-inhiberende virkning av SCH 66336 er blitt vist å vare opp til 72 timer etter behandlingen. Kombinasjon av de to medikamenter kan således føre til en "vedvarende" inhibering av MAPK-reaksjonsveien over et langt tidsrom, fortrinnsvis over et tidsrom  
 10 som begynner 6 timer etter behandlingen eller tidligere, og som fortrinnsvis fortsetter opp til 36 timer, mer foretrukket 72 timer, etter behandlingen (se f.eks. fig. 6).

Begrepet "dreping av cancerceller" betyr induksjon av  
 15 celledød av transformerte, tumorigene cancerceller.

#### Mer detaljerte eksempler på FPT-inhibitorer

Eksempler på forbindelser som er FPT-inhibitorer og litteratur som gjelder disse forbindelser, gis nedenfor.

20 Trisykliske benzosykloheptapyridiner med kondenserte ringer: WO 95/10514; WO 95/10515; WO 95/10516; WO 96/30363; WO 96/30018; WO 96/30017; WO 96/30362; WO 96/31111; WO 96/31478; WO 96/31477; WO 96/31505; WO 97/23478; internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/17314 (WO 98/15556); internasjonal patentsøknad nr.  
 25 PCT/US97/15899 (WO 98/11092); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15900 (WO 98/11096); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15801 (WO 98/11106); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15902 (WO 98/11097); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15903 (WO 98/11098); internasjonal patentsøknad nr.  
 30 PCT/US97/15904; internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15905 (WO 98/11099); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15906 (WO 98/11100); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/15907 (WO 98/11093); internasjonal patentsøknad nr. PCT/US97/19976 (WO 98/11091); US patentsøknad nr. 08/877049; US patentsøknad nr.  
 35 08/877366; US patentsøknad nr. 08/877399; US patentsøknad nr. 08/877336; US patentsøknad nr. 08/877269; US patentsøknad nr. 08/877050; US patentsøknad nr. 08/877052; US patentsøknad nr. 08/877051; US patentsøknad nr. 08/877498; US patentsøknad nr. 08/877057; US patentsøknad nr. 08/877739; US patentsøknad nr.



08/877677; US patentsøknad nr. 08/877741; US patentsøknad nr. 08/877743; US patentsøknad nr. 08/877457; US patentsøknad nr. 08/877673; US patentsøknad nr. 08/876507; og US patentsøknad nr. 09/216 398.

5 Noen FPT-inhibitorer er oligopeptider, fortrinnsvis tetrapeptider, eller derivater av slike, basert på formelen Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>, hvor Xaa<sub>3</sub> står for en serin-, metionin- eller glutaminrest, og hvori Xaa<sub>1</sub> og Xaa<sub>2</sub> kan stå for et bredt utvalg av aminosyrerester, men fortrinnsvis aminosyrerester med en  
10 alifatisk sidekjede. Derivatene av disse kan ha tre peptidbindinger, men ikke nødvendigvis; det er således blitt funnet at reduksjon av en peptidbinding -CO-NH- til en sekundær amingruppe, eller til og med erstatning av nitrogenatomene i peptidkjeden med karbonatomer (forutsatt at visse faktorer som  
15 molekylets generelle form og separasjonen av endene stort sett er konserverte) gir forbindelser som ofte er mer stabile enn oligopeptidene og som, dersom de er aktive, har mer langvarig aktivitet. Slike forbindelser betegnes heri peptidetterlignende forbindelser.

20 Oligopeptider (hovedsakelig tetrapeptider, men også pentapeptider) innbefattet formelen Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>: EPA 461 489; EPA 520 823; EPA 528 486 og WO 95/11917.

Peptidetterlignende forbindelser - særlig Cys-Xaa-Xaa-Xaa: EPA 535 730; EPA 535 731; EPA 618 221; WO 94/09766; WO  
25 94/10138; WO 94/07966; US 5 326 773; US 5 340 828; US 5 420 245; WO 95/20396; US 5 439 918; og WO 95/20396.

Farnesylerte peptidetterlignende forbindelser - særlig farnesylerte Cys-Xaa-Xaa-Xaa: GB-A 2 276 618.

Andre peptidetterlignende forbindelser: US 5 352 705;  
30 WO 94/00419; WO 95/00497; WO 95/09000; WO 95/09001; WO 95/12612; WO 95/25086; EPA 675 112; og FR-A 2 718 149.

Farnesyllderivater: EPA 534 546; WO 94/19357; WO 95/08546; EPA 537 007; og WO 95/13059.

Naturprodukter og derivater av disse: WO 94/18157; US  
35 5 430 055; GB-A 2 261 373; GB-A 2 261 374; GB-A 2 261 375; US 5 420 334; US 5 436 263.

Andre forbindelser: WO 94/26723; WO 95/08542; US 5 420 157; WO 95/21815; WO 96/31501; WO 97/16443; WO 97/21701; US 5 578 629; US 5 627 202; WO 96/39137; WO 97/18813; WO

97/27752; WO 97/27852; WO 97/27853; WO 97/27854; WO 97/36587; WO  
97/36901; WO 97/36900; WO 97/36898; WO 97/36897; WO 97/36896; WO  
97/36892; WO 97/36891; WO 97/36890; WO 97/36889; WO 97/36888; WO  
97/36886; WO 97/36881; WO 97/36879; WO 97/36877; WO 97/36876; WO  
5 97/36875; WO 97/36605; WO 97/36593; WO 97/36592; WO 97/36591; WO  
97/36585; WO 97/36584; og WO 97/36583.

Et plasmid som koder for en  $\alpha$ - og en  $\beta$ -subenhet av en  
FPT, og beskrivelse av en analyse for denne: WO 94/10184.

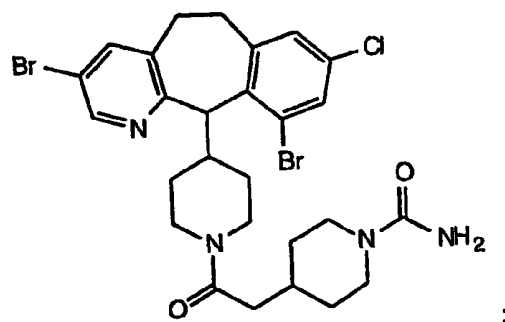
Det vises også til US patentsøknad nr. 09/217 335 og  
10 internasjonal patentsøknad PCT/US98/26224 som beskriver en rekke  
fremgangsmåter for kombinasjon av FPT-inhibitorer og kjemotera-  
peutiske midler og/eller strålebehandling for behandling av  
proliferativ sykdom, f.eks. cancer.

En oversikt over mange slike forbindelser gis av  
15 Graham i Exp. Opin. Ther. Patents (1995) 5(12): 1269-1285.

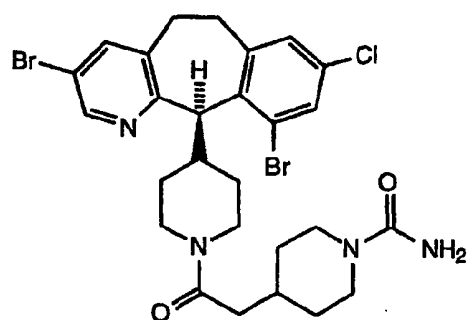
Det vil forstås at omfanget av en kjemisk formel i en  
patentbeskrivelse ikke nødvendigvis tillater klassifisering av  
alle forbindelser som formelen omfatter under en av hoved-  
gruppene angitt ovenfor. For eksempel kan monoterpenylkjeden i  
20 farnesylderivatene forlenges, f.eks. med et antall metylen-  
grupper, eller til og med en annen isoprenrest.

Tetrapeptidene med formelen Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub> har en  
aminoterminal cysteinrest. Et tetrapeptid av denne type danner  
karboksyterminalen i ras. Slike tetrapeptider kan bindes til FPT  
25 og konkurrere med ras. Forbindelser med lignende struktur, men  
hvor minst én av karbonylgruppene i tetrapeptidet er erstattet  
med en hydrokarbylgruppe, f.eks. en metylengruppe, og som  
ovenfor klassifiseres som peptidetterlignende forbindelser, kan  
også bindes til FPT og konkurrere med ras, men er generelt mer  
30 resistent overfor enzymatisk degradering *in vivo*.

Den forbindelse som anvendes som FPT-inhibitor ifølge  
foreliggende oppfinnelse har formelen:



dvs. forbindelsen 4-[2-[4-[(8-klor-3,10-dibrom-6,11-dihydro-  
 15 5H-benzo[5,6]syklohepta[1,2-b]pyridin-11-yl)-1-piperidinyll]-2-  
 oksyetyl]-1-piperidinkarboksamid, og (+)-isomeren av denne,  
 som har strukturen



Se også US patentskrifter nr. 5 719 148 (tildelt 17. februar  
 30 1998) og 5 874 442 (tildelt 23. februar 1999).

FPT-inhiberingen og anti-tumoraktiviteten til forbind-  
 elsen som anvendes som FPT-inhibitor kan bestemmes ved frem-  
 gangsmåter som er kjent innen faget - se f.eks. *in vitro*-  
 enzymanalysene, de cellebaserte analyser, cellematteanalysene og  
 35 *in vivo*-anti-tumorundersøkelsene i WO 95/10516, publisert 20.  
 april 1995, og mykagaranalysen i WO 97/23478, publisert 3. juli  
 1997.

Anvendelse av kjemoterapi og/eller strålebehandling som ytterligere midler i behandlingene

Kjemoterapeutiske midler og/eller stråling kan om ønskelig adderes til behandlingsskjemaene (i tillegg til kombinasjonen av (1) en farnesylproteintransferase-(FPT)-inhibitor og (2) ytterligere en Ras-signalreaksjonsveihinhibitor). For anvendelse av kjemoterapi og/eller strålebehandling i kombinasjon med kun en FPT-inhibitor, kan det vises til Liu, M. et al., Cancer Res. 58:4947-4956 (1998) og US patent-søknad USSN 09/217 335.

Klasser av forbindelser som kan anvendes som det kjemoterapeutiske middel, omfatter: alkylerende midler, anti-metabolitter, naturprodukter og derivater av disse, hormoner og steroider (innbefattet syntetiske analoger), og syntetiske forbindelser. Eksempler på forbindelser i disse klassene gis nedenfor.

Alkylerende midler (innbefattet sennepsgasser, etyleniminderivater, alkylsulfonater, nitrosoureaer og triazener): uracilmustard, klormetin, syklofosamid, ("Cytosan"), ifosfamid, melfalan, klorambucil, pipobroman, trietylenmelamin, trietylen-tiofosforamin, busulfan, carmustin, lomustin, streptozocin, dacarbazin og temozolomid.

Antimetabolitter (innbefattet folsyreantagonister, pyrimidinanaloger, purinanaloger og adenosindeaminaseinhibitorer): metotreksat, 5-fluoruracil, floksuridin, cytarabin, 6-merkaptopurin, 6-tioguanin, fludarabinfosfat, pentostatin og gemcitabin.

Naturprodukter og derivater av disse (innbefattet vinka-alkaloider, antibiotika med anti-tumorstyrking, enzymer, lymfokiner og epipodofyllotoksiner): vinblastin, vinkristin, vindesin, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doksorubicin, epirubicin, idarubicin, paclitaxel (paclitaxel er kommersielt tilgjengelig som "Taxol"), mitramycin, deoksykoformycin, mitomycin-C, L-asparaginase, interferoner (særlig IFN- $\alpha$ ), etoposid og teniposid.

Hormoner og steroider (innbefattet syntetiske analoger): 17 $\alpha$ -etynyløstradiol, dietylstilbestrol, testosteron, prednison, fluoksymesteron, dromostanolonpropionat, testolakton, megestrolacetat, tamoksifen, metylprednisolon, metyltestosteron,

prednisolon, triamcinolon, klortrianisen, hydroksyprogesteron, aminoglutetimid, estramustin, medroksyprogesteronacetat, leuprolid, flutamid, toremifen, zoladex.

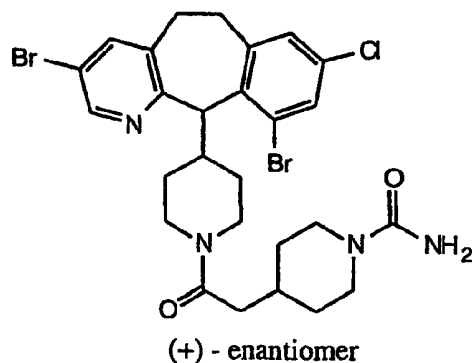
Syntetiske forbindelser (innbefattet uorganiske komplekser som platina-koordinasjonskomplekser): cisplatin, karboplatin, hydroksyurea, amsakrin, prokarbazin, mitotan, mitoksantron, levamisol og heksametylmelamin.

Fremgangsmåter for sikker og effektiv tilførsel av de fleste av disse kjemoterapeutiske midlene er kjent blant fagfolk. I tillegg beskrives tilførsel av disse i standardlitteraturen. For eksempel beskrives tilførsel av mange av de kjemoterapeutiske midlene i "Physicians' Desk Reference" (PDR), f.eks., 1996-utgaven (Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645-1742 USA).

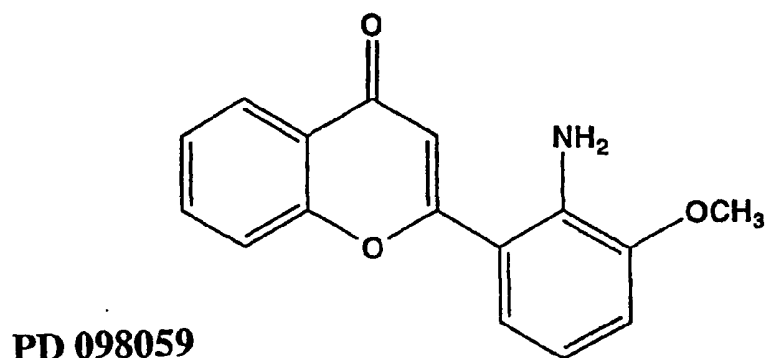
#### Eksempler

Eksemplene som gis nedenfor, beskriver virkningen av en kombinasjon av en FPT-inhibitor (SCH 66336) og en MEK-inhibitor (enten PD098059 eller U0126) på programmert celledød (apoptose) i H-Ras-transformerte Rat2-celler. I likhet med tumorcellelinjer viser disse cellene en fullt transformert fenotype, innbefattet evnen til å vokse forankringsuavhengig i mykagar og som xenotransplantater i nakne mus.

Den FPT-inhiberende forbindelse som ble anvendt i de påfølgende eksemplene (SCH 66336, Schering-Plough Research Institute) har følgende formel:

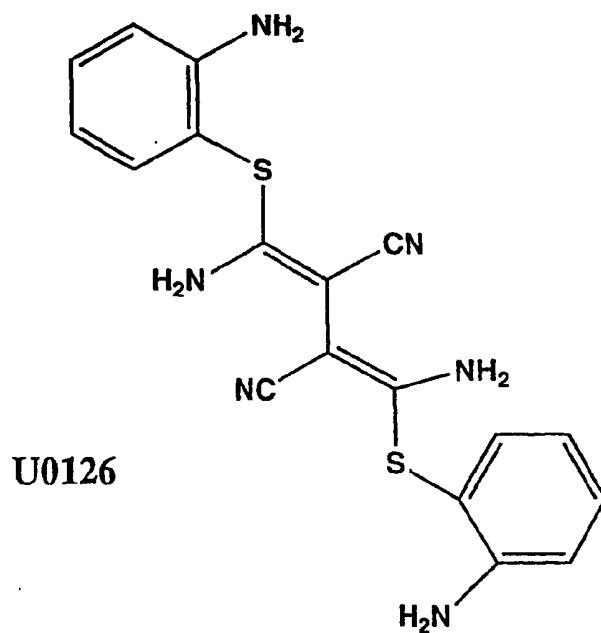


"PD 098059", en spesiell MEK-inhibitor, har den kjemiske struktur:



15 PD 098059 beskrives i mer detalj i Dudley et al., 1995. Dudley et al. nevner at det frysetørkede, faste stoff må rekonstitueres i DMSO for reagenskonsentrasjonene som anvendes i eksperimentene som beskrives her.

"U0126", et annet eksempel på en MEK-inhibitor, har  
20 følgende kjemiske struktur:



U0126 beskrives i mer detalj i Favata et al., 1998. Favata et al. nevner også at det frysetørkede, faste stoff må rekonstitueres i DMSO for reagenskonsentrasjonene som anvendes i eksperimentene som beskrives her.

5

## Materialer og fremgangsmåter

### Cellelinjer og behandlinger

I alle tilfeller inneholdt Ras-sekvensene en  
 10 aktiverende Gly<sup>12</sup> til Val-mutasjon. H-ras (G12V;CVLL)  
 representerer en Ser<sup>189</sup> til Leu-mutasjon som gir en  
 geranylgeranylert form av H-ras-proteinet. cDNA som  
 representerer disse H-ras-proteinene var subklonet i pMV7-  
 plasmidet for dannelse av stabilt Ras-uttrykkende Rat2-  
 15 cellelinjer ved retroviral transduksjon og seleksjon med  
 neomycingenet (Kirschmeier et al., 1988). De stabile  
 cellelinjene som presenteres her, representerer enkeltkloner av  
 Ras-uttrykkende, neomycinselekterte celler. H-ras (G 12V)/Rat2,  
 H-ras (G 12V;CVLL)/Rat2- og parenterale Rat2-celler ble dyrket i  
 20 DMEM tilsatt 10% føtalt kalveserum, penicillin, streptomycin,  
 ikke-essensielle aminosyrer og L-glutamin, og for Ras-transfor-  
 mantene, 200 µg/ml Geneticin (Gibco/BRL; Gaithersburg, MD). Alle  
 ras-transformerte celler viste en fullt transformert fenotype,  
 innbefattet forankringsuavhengig vekst og tumorigene egenskaper.  
 25 PD098059 (A385-023-M005; Alexis Corporation; San  
 Diego, CA) og U0126 (nr. V1121; Promega Corporation; Madison,  
 WI) ble anvendt ifølge Dudley et al. (1995) og Favata et al.  
 (1998).

### 30 FACS-analyse

FACS-analysen ble utført ved anvendelse av standard-  
 fremgangsmåter. Cellene ble høstet ved behandling med trypsin/-  
 EDTA, trypsin ble nøytralisert med DMEM tilsatt 10% FCS, og  
 cellene ble nedsentrifugert ved 500 x g i 5 minutter. Cellene  
 35 ble vasket med PBS og nedsentrifugert, resuspendert i 0,5 ml PBS  
 og fiksert med 2 ml iskald aceton:metanol (1:1) i 30 minutter  
 ved -20 °C. For merking av kromosomalt DNA med propidiumjodid  
 (PI) ble de fikserte cellene vasket to ganger med PBS før de ble  
 resuspendert ved 1 x 10<sup>6</sup> celler/ml i PBS, 75 µg/ml PI

(Calbiochem; La Jolla, CA, 500 µg/ml RNase (Sigma; St. Louis, MO), for inkubering i 30 minutter ved romtemperatur. Cellene ble filtrert gjennom en 35 µm silhette (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) og lagret ved 4 °C før FACS-analyse i en FACS-Calibur (Becton Dickinson; Mountain View, CA). Kvantifiseringen ble utført ved anvendelse av CellQuest (Becton Dickinson; Mountain View, CA).

#### Caspaseaktivitetsanalyse

H-ras-transformerte Rat2-celler og parenterale Rat2-celler ble behandlet med 20 µM PD098059, 0,5 µM SCH 66336 eller en kombinasjon av de to medikamenter i 36 timer ved 37 °C. Cellene ble høstet med trypsin/EDTA, nedsentrifugert ved 500 x g i 5 minutter, vasket med PBS og nedsentrifugert igjen. Cellene ble resuspendert/lysert i en lyseringsbuffer (ApoAlert CPP32/Caspase-3 Assay Kit; Clontech laboratories; Palo Alto, CA) inneholdende proteaseinhibitorene "Complete" (Boehringer Mannheim; Tyskland), inkubert i 10 minutter på is og sentrifugert i 3 minutter ved 12 000 rpm ved 4 °C som anbefalt i Clontech-fremgangsmåten. Proteinkonsentrasjonen i lysatene ble bestemt ved anvendelse av BCA-proteinanalysen (Pierce; Rockford, IL) og tilnærmet 30 µg av hvert lysat ble analysert for Caspase-3-aktivitet ved fluorometri (CytoFluor plateleser; Perseptive Biosystems; Framingham, MA) ved anvendelse av et fluorogent peptidsubstrat (Ac-DEVD-AFC; Clontech; Palo Alto, CA).

#### Western-blot-analyse av fosforyleringsstatusen til ERK1 og 2

Cellene ble lysert i en detergentbuffer (levert sammen med ApoAlert CPP32/Caspase-3 Assay Kit; Clontech; Palo Alto, CA) og sentrifugert ved 14 000 rpm i 15 minutter ved 4 °C for nedsentrifugering av cellerester. Proteinkonsentrasjonen i den resulterende supernatant ble bestemt ved BCA-proteinanalyse (Pierce; Rockford, IL). Cellulære proteiner (20 µg) ble separert i 8-16% Tris-glysin-polyakrylamidgeler (Novex; San Diego, CA) og overført til PVDF-membraner for Western-blot-analyse. Fosforylerte ERK1- og ERK2-proteiner ble påvist ved anvendelse av et polyklonalt kaninantistoff spesifikt for den fosforylerte form av p42/44 MAPK (fosfo-Thr202/Tyr204-spesifikt; New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA). Totale ERK1- og ERK2-proteiner ble



påvist ved anvendelse av et polyklonalt kaninantistoff spesifikt for p42/44 MAPK (New England Biolabs, Inc.; Beverly, MA). Et HRP-konjugert, sekundært anti-kaninantistoff fra geit (Chemicon; Temecula, CA) tillot synliggjøring ved forsterket kjemiluminescens (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce; Rockford, IL).

### Resultater

#### 10 1. Virkninger på apoptose: Fluorescensaktivert celledyrkning (FACS)

Cellulære, apoptotiske responser kan måles på en rekke måter, innbefattet analyse av kromosomal DNA-fragmentering, fluorescensaktivert celledyrkning (FACS) av propidiumjodid-fargede celler, og måling av caspaseaktivering. For evaluering av den apoptotiske respons på behandling med medikamentene farget vi kromosomalt DNA i behandlede celler med propidiumjodid og analyserte enkeltcellene ved FACS. Typiske celledyrkningspopulasjoner viser en stor topp for celler i G1/G0-fasen av celledyrklus, med en mindre topp som representerer G2/M-faseceller. Mellom de to toppene ligger cellene i S-fasen av celledyrklusen. Celler som viser DNA-merking foran G1/G0-toppen, representerer celler med fragmentert DNA som utgjør mindre enn den diploide mengde med kromosomalt DNA, og således gjennomgår celledød (Dengler et al., 1995). Denne målingen gir en relativ apoptosekvantifisering som kan sammenlignes med andre apoptoseanalyser innbefattet TdT-formidlet dUTP-"nick"-endemerking (TUNEL-analyse); Gorczyca et al., (1993) Cancer Res. 53: 1945-51. I eksperimentene nedenfor bestemte vi prosentandelen relativt til den totale celledyrpopulasjon i subG0/G1-toppen som et mål på prosent apoptose.

Behandling av H-Ras-transformerte Rat2-celler med PD098059 alene i 36 timer førte til en doseavhengig økning av antall apoptotiske celler (fig. 2). Ved en konsentrasjon på 20 µM PD098059 var 50% av cellene apoptotiske. Dersom dose-responsmålingen for PD098059 ble gjentatt i nærvær av 100 nM SCH 66336, ble et svært forskjellig resultat observert. I nærvær av 100 nM SCH 66336 alene var 30% av cellene apoptotiske. Ved behandling med kombinasjonen ble over 60% av cellene drevet inn

i apoptose ved anvendelse av så lite som 2,5  $\mu$ M PD098059. Konsentrasjonen av PD098059 som var nødvendig for å oppnå 50% apoptose, var 20  $\mu$ M når denne forbindelse ble anvendt alene, men var  $\leq$  1  $\mu$ M ved anvendelse i kombinasjon med FPT-inhibitoren.

5 Dette viser at SCH 66336 i signifikant grad gjør cellene mer følsomme for de pro-apoptotiske virkninger av PD098059.

Det motsatte forsøk ble også utført. Behandling med SCH 66336 alene i 36 timer induserte en doseavhengig, apoptotisk respons (fig. 3). Ved anvendelse av 0,75  $\mu$ M SCH 66336 var 70% av  
10 cellene apoptotiske. Ved anvendelse alene var konsentrasjonen av SCH 66336 som var nødvendig for induksjon av 50% apoptose, mellom 0,25 og 0,5  $\mu$ M. Dose-responskurven for SCH 66336 viste en forskyvning mot venstre i nærvær av 2,5  $\mu$ M PD098059, noe som tyder på en forsterket apoptotisk respons. I nærvær av PD098059  
15 var konsentrasjonen av SCH 66336 som var nødvendig for induksjon av 50% apoptose, 50 nM.

Et lignende sett med eksperimenter ble utført med en strukturelt forskjellig MEK-inhibitor, U0126 (fig. 4). I likhet med PD098059 er U0126 en svært selektiv inhibitor av proteinene  
20 MEK1 og 2, og viser kraftig inhibering av disses kinaseaktivitet (Farata et al. 1990). Behandling med U0126 alene førte til en doseavhengig induksjon av apoptose i H-Ras-transformerte Rat2-celler, med 17% apoptotiske celler observert ved anvendelse av en konsentrasjon på 10  $\mu$ M. Når dette eksperiment ble gjentatt i  
25 nærvær av 0,5  $\mu$ M SCH 66336 (en konsentrasjon som induserte 14% apoptose alene), ble en mer enn additiv respons observert med kombinasjonen. Kombinasjonen av 10  $\mu$ M U0126 og 0,5  $\mu$ M SCH 66336 førte til at over 50% av cellene var apoptotiske.

Disse resultatene viser en signifikant økning av den  
30 proapoptotiske virkning i H-Ras-transformerte Rat2-celler av MEK-inhibitorer og SCH 66336 ved analyse i kombinasjon. I motsetning til disse resultatene var ikke-transformerte, parenterale Rat2-celler eller Rat2-celler transformert med aktivert Ki-Ras, ikke følsomme for apoptose indusert med noen av  
35 medikamentene alene, eller ved kombinasjonen av SCH 66336 og PD098059 (resultater ikke vist). Mangelen på virkning i de Ki-Ras-transformerte Rat2-cellene kan delvis forklares ved nylige observasjoner om at noen Ras-isoformer (Ki-Ras og N-Ras) blir alternativt prenylert av geranylgeranyltransferase 1, både in

*vitro* og i celler behandlet med FPT-inhibitorer (Zhang et al., 1997; White et al., 1997).

## 2. Virkninger på apoptose: Caspaseaktivering

5 Caspaser utgjør en evolusjonsmessig konserverte familie av enzymer som proteolytisk degraderer og nedbryter cellen som respons på proapoptotiske signaler (se oversikt i Thornberry og Lazebnik, 1998). For evaluering av apoptose ved anvendelse av dette særpregede biokjemiske slutt punkt målte vi caspase-  
10 aktivitet i cellelysater fremstilt fra H-Ras-transformerte Rat2-celler ved anvendelse av en fluorometrisk analyse av caspase 3-aktivitet (Apo-Alert CPP32/Caspase-3 Assay; Clontech). Behandling av de H-Ras-transformerte cellene i 24 timer med enten 0,5  $\mu$ M SCH 66336 eller 20  $\mu$ M PD098059 alene ga en økning  
15 av caspaseaktiviteten over bakgrunnsnivået i ubehandlede celler (fig. 5). Disse resultatene er i samsvar med de proapoptotiske virkninger av hvert av medikamentene observert ved FACS-analyse (fig. 2 etter 36 timer). Når H-Ras-transformerte Rat2-celler ble behandlet med en kombinasjon av begge medikamenter, ble en mer  
20 enn additiv caspase-3-respons observert, noe som igjen bekrefter FACS-resultatene.

Liten eller ingen caspaseaktivering ble observert i de parentale Rat2-cellene ved behandling med enten enkeltmedikamenter eller en kombinasjon av begge medikamenter (fig. 5).

## 3. Virkninger på MAPK-fosforylering

25 Vi undersøkte evnen til FPT-inhibitoren SCH 66336 og MEK-inhibitoren PD098059 til å blokkere MEK-aktivering i H-ras-transformerte Rat2-celler ved å måle fosforyleringsstatus til  
30 substratene ERK1 og ERK2 (44 hhv. 42 Kd). Behandling av cellene med 20  $\mu$ M PD098059 ga redusert fosforylering av begge proteiner (fig. 6). Maksimal inhibering ble observert ved det første undersøkte tidspunkt (6 timer), og fosforyleringen forble undertrykt gjennom hele tidsintervallet på 36 timer. Behandling av  
35 cellene med 0,5  $\mu$ M SCH 66336 reduserte fosforyleringen av begge proteiner på en tidsavhengig (fig. 6) og doseavhengig måte (resultater ikke vist), hvor 0,5  $\mu$ M SCH 66336 viste maksimal inhibering mellom 24 og 36 timers behandling. I begge tilfeller var inhiberingen av fosforyleringen mer uttalt for ERK1-

proteinet på 44 kDa. Selv om proteinenes fosforyleringsstatus var redusert, var totalmengden av disse proteinene stort sett upåvirket av medikamentbehandlingen (fig. 6, nedre felter).

## 5 Diskusjon

FPT-inhibitorer som SCH 66336 og MEK-inhibitorer som PD098059 og U0126, er rettet mot separate trinn i en felles signaloverføringsvei. Det er overraskende at de to midlene ved kombinasjon har mer enn additiv virkning på apoptose i H-Ras-transformerte Rat2-celler målt enten ved FACS-analyse av subG0/G1-populasjonen eller ved caspaseaktivering. Uten å ville begrenses av noen spesiell teori, foreligger det to mulige forklaringer på denne observasjonen. For det første er det mulig at denne kombinasjonen fører til en mer fullstendig eller mer langvarig (vedvarende) inhibering av den lineære reaksjonsvei som er skissert i fig. 1. Alternativt kan effektiviteten av kombinasjonen tilskrives det faktum at intracellulære signalreaksjonsveier er betydelig mer komplisert og forbundne med hverandre enn reaksjonsveien avbildet i fig. 1. Et mer komplisert koblingsdiagram er vist i fig. 7. Som nevnt tidligere, er det klart at disse reaksjonsveiene forgrenes i flere trinn langs reaksjonsveien. Vekstfaktorreseptorer aktiverer flere signalreaksjonsveier via SH2-formidlede interaksjoner. Likeså er flere Ras-effektorer blitt identifisert ved anvendelse av 2-hybridsystemet i gjær og andre biokjemiske tilnærminger. Den kombinerte virkning av en FPT-inhibitor og en MEK-inhibitor kan tilskrives virkninger av disse på atskilte grener av disse reaksjonsveiene. I tillegg til å blokkere H-Ras-formidlet aktivering av MEK kan FPT-inhibitorer f.eks. også blokkere andre Ras-effektorreaksjonsveier (f.eks. PI3K-reaksjonsveien og Rho-reaksjonsveien). Likeså foreligger bevis for Ras-uavhengig aktivering av MEK/MAPK-reaksjonsveien (Duckworth og Cantley, 1997; Morrison og Cutler, 1997). Selv om de molekylære bestanddeler av denne Ras-uavhengige reaksjonsvei ennå ikke er fullt ut identifisert, tyder dette på at en FPT-inhibitor alene ikke kan skru av alle reaksjonsveier som fører til MEK/MAPK-aktivering. Følgelig kan en kombinasjon av disse to inhibitorklassene føre til en mer fullstendig blokkering.

Uavhengig av mekanismen viser *ex vivo*-resultatene med kombinasjonen av SCH 66336 og PD098059 en slående forsterking av apoptoseinduserende aktivitet. Videre kan denne type forhøyet virkning i kombinasjonen utvides til å omfatte andre midler som er rettet mot signaloverføringsreaksjonsveier (f.eks. midler som blokkerer vekstfaktorreseptorer). Som angitt ovenfor, kan slike virkninger skyldes (i) en mer fullstendig inhibering av vekstfaktor-Ras-signalreaksjonsveien enn hva som oppnås ved behandling med et enkelt middel, eller (ii) samtidig inhibering av flere signalreaksjonsveier. For eksempel kan mange tumorer styres av virkningen av flere vekstfaktorer som alle virker på en autokrin eller parakrin måte for aktivering av proliferasjonen via sine tilhørende reseptorer. Blokkering av én av disse reseptorreaksjonsveiene ved anvendelse av antistoffer eller tyrosinkinaseinhibitorer kan gi en antitumorvirkning ved at den angjeldende signalreaksjonsvei blokkeres, imidlertid vil andre reseptorstyrte reaksjonsveier ikke påvirkes. Tilsetning av en FPT-inhibitor kan skru av signaliseringen fra disse andre reaksjonsveiene, noe som fører til en mer fullstendig inhibering av signaloverføringen hvorved det fremvises en synergistisk antitumorvirkning. Siden vekstfaktorreseptorer vites å innlede flere signalkaskader (f.eks. Ras/MEK, fosfolipase C $\gamma$ , og PI3K), kan videre inhibering av Ras-reaksjonsveien med en FPT-inhibitor eller en MEK-inhibitor være uten virkning på signalkapasiteten til disse andre reaksjonsveiene. Tilsetning av et antistoff mot en vekstfaktorreseptor eller en tyrosinkinaseinhibitor til en tumorcelle behandlet med en FPT-inhibitor, kan således føre til en mer fullstendig inhibering av signaliseringen og gi en synergistisk antitumorvirkning ved at de reaksjonsveier som ikke påvirkes av FPT-inhibitoren, skrur av.

Lignende typer av synergi kan også observeres ved å kombinere FPT-inhibitorer med midler som er rettet mot andre trinn i disse signalreaksjonsveiene (f.eks. Raf-inhibitorer, SH2-inhibitorer, PI3K-inhibitorer, osv.).

### Farmasøytiske preparater

Inerte, farmasøytisk aksepterbare bærerstoffer som anvendes for fremstilling av farmasøytiske preparater av FPT-inhibitorene og Ras-signalreaksjonsveihinhibitorene som beskrives

heri, kan være faste eller flytende. Faste preparater omfatter pulvere, tabletter, dispergerbare granulater, kapsler, drops og stikkpiller. Pulvere og tabletter kan omfatte fra tilnærmet 5 til tilnærmet 70% aktiv bestanddel. Egnede faste bærerstoffer er

5 kjent innen faget, f.eks. magnesiumkarbonat, magnesiumstearat, talkum, sukker og/eller laktose. Tabletter, pulvere, drops og kapsler kan anvendes som faste doseringsformer egnet for oral tilførsel.

For fremstilling av stikkpiller smeltes først en voks

10 med lavt smeltepunkt, f.eks. en blanding av fettsyreglyserider eller kakaosmør, og den aktive bestanddel fordeles homogent deri, f.eks. ved omrøring. Den smeltede, homogene blanding uthelles så i former med egnet størrelse, avkjøles og stivner.

Flytende preparater omfatter løsninger, suspensjoner

15 og emulsjoner. Som et eksempel kan nevnes vann eller vann-propylenglykolløsninger for parenteral injeksjon. Flytende preparater kan også omfatte løsninger for intranasal tilførsel.

Aerosolpreparater egnet for inhalasjon, kan omfatte løsninger og faste stoffer i pulverform, eventuelt kombinert med

20 et farmasøytisk aksepterbart bærerstoff, f.eks. en inert, komprimert gass.

Videre omfattes faste preparater beregnet på overføring til flytende preparater kort tid før anvendelse, enten for oral eller parenteral tilførsel. Slike flytende former

25 omfatter løsninger, suspensjoner og emulsjoner.

FPT-inhibitorene og de ekstra Ras-reaksjonsveiiinhibitorer som beskrives heri, kan også tilføres transdermalt. Transdermale preparater kan være utformet som kremer, losjoner, aerosoler og/eller emulsjoner og kan inngå i et transdermalt

30 plaster av matriks- eller reservoartype, som sedvanlig innen faget for dette formål.

Forbindelsene tilføres fortrinnsvis oralt.

Det farmasøytiske preparat foreligger fortrinnsvis i enhetsdoseform. I en slik form oppdeles preparatet i enhetsdoser

35 som inneholder egnede mengder av den aktive bestanddel, f.eks. en effektiv mengde for oppnåelse av det ønskede formål.

Mengden aktiv forbindelse i en enhetsdose av preparater kan variere eller justeres fra tilnærmet 0,5 mg til

1 000 mg, fortrinnsvis fra tilnærmet 1 mg til 300 mg, mer foretrukket fra 5 mg til 200 mg, ut fra den angjeldende anvendelse.

Den dose som faktisk anvendes, kan variere avhengig av pasientens krav og omfanget av tilstanden som skal behandles.

- 5 Bestemmelse av korrekt dose for en gitt situasjon ligger innen teknikkens stand. Generelt innledes behandlingen med lavere doser som er lavere enn den optimale dose av forbindelsen. Deretter økes dosen i små trinn inntil den optimale virkning under de foreliggende omstendigheter nås. For enkelhets skyld  
10 kan om ønskelig den totale daglige dose oppdeles og tilføres i porsjoner i løpet av dagen.

- Mengde og tilførselsfrekvens av FPT-inhibitorene og de ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitorene vil reguleres ut fra den behandelende leges vurderinger idet det tas i betraktning  
15 faktorer som pasientens alder, tilstand og størrelse, så vel som omfanget av sykdommen som skal behandles. Generelt kan dosen av en FPT-inhibitor (ved anvendelse som et enkelt middel) tenkes å ha en øvre grense på 2 000 mg/dag og vil fortrinnsvis ligge i området fra 50 til 400 mg/dag. I kombinasjonsbehandlingen er  
20 imidlertid et foretrukket lavdoseskjema for FPT-inhibitoren, f.eks. oral tilførsel av en mengde i området fra 1,4 til 400 mg/dag, mer foretrukket fra 1,4 til 350 mg/dag, enda mer foretrukket fra 3,5 til 70 mg/dag, fortrinnsvis med et B.I.D.-doseringskjema. Et spesielt lavdoseringsområde kan være 1,4 til  
25 70 mg/dag.

- De ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitorene kan tilføres ifølge terapeutiske fremgangsmåter som er velkjente innen faget. Se f.eks. Pegram, M.D. et al. (1998). J. Clin. Oncol. 16: 2659-2671. Det vil være åpenbart for fagfolk at tilførsel av den  
30 ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor kan variere avhengig av sykdommen som behandles og de kjente virkninger av den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor på den angjeldende sykdom. Ut fra den erfarne klinikers kunnskaper kan også de terapeutiske fremgangsmåter (f.eks. dosemengder og tilførselstidspunkter) varieres ut  
35 fra de observerte virkninger av de tilførte terapeutiske midler (dvs. den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor) på pasienten, og også ut fra de observerte sykdomsresponser på de tilførte terapeutiske midler. Generelt kan dosen av en ekstra Ras-signalreaksjonsveihinhibitor (ved anvendelse som et enkelt

middel), f.eks. ligge i området fra 5 til 2 000 mg/dag. I kombinasjonsbehandlingen ifølge foreliggende oppfinnelse er et foretrukket lavdoserings skjema for en ekstra Ras-signalreaksjonsveihinhibitor (f.eks. en MEK-inhibitor) tilførsel av en  
5 mengde i området fra 1 til 350 mg/dag, mer foretrukket fra 3,5 til 70 mg/dag, fortrinnsvis med et B.I.D.-doserings skjema. Et spesielt lavdoseringsområde kan være fra 1 til 70 mg/dag.

I et foretrukket eksempel på kombinasjonsbehandlingen ved behandling av cancere (f.eks. bukspyttkjertelcancer, lunge-  
10 cancer eller urinblærecancer) er FPT-inhibitoren SCH 66336, som identifisert tidligere, tilført oralt i en mengde på 70 mg/dag oppdelt i to doser, i et kontinuerlig doserings skjema, og den ekstra Ras-signalreaksjonsveihinhibitor kan være PD098059 (eller en analog av denne), tilført i en mengde på 350 mg/dag oppdelt i  
15 to doser, ved et kontinuerlig doserings skjema.

I et annet foretrukket eksempel på kombinasjonsbehandlingen ved behandling av cancere (f.eks. bukspyttkjertelcancer, lungecancer eller urinblærecancer) er FPT-inhibitoren SCH 66336 som identifisert tidligere, tilført oralt i en mengde på 70  
20 mg/dag oppdelt i to doser, ved et kontinuerlig doserings skjema, og den ekstra Ras-signalreaksjonsveihinhibitor er U0126 (eller en analog av denne) tilført i en mengde på 350 mg/dag oppdelt i to doser, ved et kontinuerlig doserings skjema.

I metodene tilføres en FPT-inhibitor samtidig med  
25 eller sekvensielt med en ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor. Det er således ikke nødvendig at f.eks. den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor og FPT-inhibitoren skal tilføres samtidig eller i det vesentlige samtidig. Fordelen ved samtidig eller i det vesentlige samtidig tilførsel kan lett bestemmes av en erfaren  
30 kliniker.

Generelt må heller ikke FPT-inhibitoren og den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor tilføres i samme farmasøytiske preparat, og det kan grunnet forskjellige fysiske og kjemiske egenskaper være nødvendig å tilføre disse via forskjellige  
35 tilførselsveier. For eksempel kan FPT-inhibitoren tilføres oralt for å oppnå og opprettholde et godt nivå i blodet av denne, mens den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor kan tilføres intravenøst. Bestemmelse av tilførselsvei og hvor tilrådelig det vil være med tilførsel hvor mulig i samme farmasøytiske preparat, ligger godt



innenfor den erfarne klinikers kunnskapsområde. Den innledende tilførsel kan gjøres ifølge etablerte fremgangsmåter som er kjent innen faget, hvorefter doser, tilførselsveier og tilførselstidspunkter kan modifiseres av den erfarne kliniker basert på de observerte virkninger.

Valg av ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor vil avhenge av de behandlende legers diagnoser og deres vurderinger vedrørende pasientens tilstand og den egnede behandlingsfremgangsmåte.

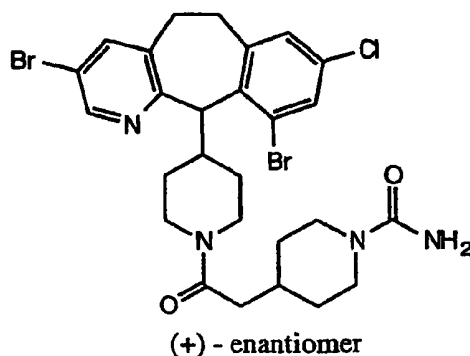
FPT-inhibitoren og den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor kan tilføres på samme tid (f.eks. samtidig, i det vesentlige samtidig eller innenfor samme behandlingsfremgangsmåte) eller sekvensielt avhengig av den proliferative sykdoms natur, pasientens tilstand og det faktiske valg av ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor for tilførsel til samme tid (dvs. i samme behandlingsfremgangsmåte) som FPT-inhibitoren.

Dersom FPT-inhibitoren og den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor ikke tilføres samtidig eller i det vesentlige samtidig, er ikke nødvendigvis rekkefølgen for tilførsel av FPT-inhibitor og den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor viktig. Således kan FPT-inhibitoren tilføres først, fulgt av tilførsel av den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor, eller den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor kan tilføres først, fulgt av tilførsel av FPT-inhibitoren. Denne alternerende tilførsel kan gjentas i løpet av én enkelt behandlingsfremgangsmåte. Bestemmelse av tilføringsrekkefølge og antall repetisjoner av tilførselen av de to terapeutiske midlene i løpet av en behandlingsfremgangsmåte ligger godt innenfor den erfarne leges kunnskapsområde etter evaluering av sykdommen som behandles og pasientens tilstand. For eksempel kan den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor tilføres først, hvorefter behandlingen fortsetter med tilførsel av FPT-inhibitoren, fulgt av tilførsel av den ekstra Ras-reaksjonsveihinhibitor dersom dette anses fordelaktig, og så videre inntil behandlingsfremgangsmåten er fullført.

Ut fra sine erfaringer og kunnskaper kan således den behandlende lege modifisere fremgangsmåtene for tilførsel av en bestanddel (terapeutisk middel - dvs. FPT-inhibitor, ekstra Ras-reaksjonsveihinhiitor) av behandlingen ut fra den enkelte pasients behov etter hvert som behandlingen foregår.

Den behandlende lege vil ved vurdering av hvorvidt behandlingen er effektiv i den tilførte dose, ta i betraktning pasientens generelle velvære, så vel som mer definitive tegn som lindring av sykdomsforbundne symptomer, inhibering av tumorvekst, faktisk krymping av tumoren eller inhibering av metastase. Tumorens størrelse kan måles ved standardfremgangsmåter, f.eks. radiologiske undersøkelser som CAT- eller MRI-scan, og på hverandre følgende målinger kan anvendes for å vurdere hvorvidt tumorens vekst har stanset eller til og med blitt reversert. Lindring av sykdomsforbundne symptomer som smerte og forbedret generell tilstand kan også anvendes for å bidra til vurdering av behandlingens effektivitet.

Det påfølgende er eksempler (eksemplene 1-4) på kapselutforminger av den FPT-inhiberende forbindelse:



#### Eksemplene 1 og 2

##### Kapselutforming

| <u>Bestanddel</u>         | <u>Eksempel 1</u><br><u>mg/kapsel</u> | <u>Eksempel 2</u><br><u>mg/kapsel</u> | <u>%</u><br><u>av preparatet</u> |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Fast løsning              | 100                                   | 400,0                                 | 84,2                             |
| Silisium-                 |                                       |                                       |                                  |
| dioksid NF <sup>(1)</sup> | 0,625                                 | 2,5                                   | 0,5                              |
| Magnesium-                |                                       |                                       |                                  |
| stearat NF <sup>(2)</sup> | 0,125                                 | 0,5                                   | 0,1                              |
| Croscarmellose-           |                                       |                                       |                                  |
| natrium NF                | 11,000                                | 44,0                                  | 9,3                              |

|                           |         |        |     |
|---------------------------|---------|--------|-----|
| Pluronic F68              |         |        |     |
| NF                        | 6,250   | 25,0   | 5,3 |
| Silisium-                 |         |        |     |
| dioksid NF <sup>(3)</sup> | 0,625   | 2,5    | 0,5 |
| 5 Magnesium-              |         |        |     |
| stearat NF <sup>(4)</sup> | 0,125   | 0,5    | 0,1 |
| I alt                     | 118,750 | 475,00 |     |
| Kapsel-                   |         |        |     |
| størrelse nr. 4           |         | nr. 0  |     |

Fremgangsmåte (eksemplene 1 og 2)

Fremstilling av fast løsning

| <u>Forbindelse</u> | <u>g/porsjon</u> | <u>%<br/>av preparatet</u> |
|--------------------|------------------|----------------------------|
| 15 FPT-inhiberende |                  |                            |
| forbindelse        | 80               | 33,3                       |
| Povidon NF K29/32  | 160              | 66,6                       |
| Metylenklorid      | 5000 ml          | fordamper                  |

20 Krystallinsk FPT-inhiberende forbindelse og povidon ble løst i metylenklorid. Løsningen ble tørket ved anvendelse av en egnet løsemiddelspraytørker. Restmaterialet ble så overført til et fint pulver ved maling. Pulveret fikk så passere gjennom en 30 mesh sil. Pulveret ble funnet å være amorft ved røntgen-  
25 analyse.

Den faste faste løsning, silisiumdioksid<sup>(1)</sup> og magnesiumstearat<sup>(2)</sup> ble blandet i en egnet blander i 10 minutter. Blandingen sammenpresses ved anvendelse av en egnet rullepresse og males ved anvendelse av en egnet mølle utstyrt med en 30 mesh  
30 sikt. Croscarmellosenatrium, Pluronic F68 og silisiumdioksid<sup>(3)</sup> tilsettes til den malte blanding og blandes videre i 10 minutter. En forblending ble fremstilt med magnesiumstearat<sup>(4)</sup> og en lik mengde av blandingen. Forblendingen ble tilsatt til resten av blandingen og innblandet i 5 minutter, hvorefter  
35 blandingen ble innkapslet i kapselskall av hard gelatin.

Eksemplene 3 og 4Kapselutforming

|                           | <u>Eksempel 3</u> | <u>Eksempel 4</u> | <u>%</u>             |
|---------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| <u>Bestanddel</u>         | <u>mg/kapsel</u>  | <u>mg/kapsel</u>  | <u>av preparatet</u> |
| Fast løsning              | 400               | 200,0             | 80,0                 |
| Silisium-                 |                   |                   |                      |
| dioksid NF <sup>(1)</sup> | 3,75              | 1,875             | 0,75                 |
| Magnesium-                |                   |                   |                      |
| stearat NF <sup>(2)</sup> | 0,125             | 0,625             | 0,25                 |
| Croscarmellose-           |                   |                   |                      |
| natrium NF                | 40,00             | 20,00             | 8,0                  |
| Pluronic F68              |                   |                   |                      |
| NF                        | 50,00             | 25,00             | 10                   |
| Silisium-                 |                   |                   |                      |
| dioksid NF <sup>(3)</sup> | 3,75              | 1,875             | 0,75                 |
| Magnesium-                |                   |                   |                      |
| stearat NF <sup>(4)</sup> | 1,25              | 0,625             | 0,25                 |
| I alt                     | 500,00            | 250,00            |                      |
| Kapsel-                   |                   |                   |                      |
| størrelse nr. 0           |                   | nr. 2             |                      |

Fremgangsmåte (eksemplene 3 og 4)25 Fremstilling av fast løsning

|                    | <u>g/porsjon</u> | <u>%</u>             |
|--------------------|------------------|----------------------|
| <u>Forbindelse</u> |                  | <u>av preparatet</u> |
| FPT-inhiberende    |                  |                      |
| forbindelse        | 15               | 50                   |
| Povidon NF K29/32  | 15               | 50                   |
| Metylenklorid      | 140 ml           | fordamper            |
| Metanol            | 60 ml            | fordamper            |

Krystallinsk FPT-inhiberende forbindelse og povidon ble løst i en blanding av metylenklorid og metanol. Løsningen ble tørket ved anvendelse av en egnet løsemiddelspraytørker. Restmaterialet ble så redusert til et fint pulver ved maling. Pulveret fikk passere gjennom en 30 mesh sil. Pulveret ble vist å være amorft ved røntgenanalyse.

Den faste faste løsning, silisiumdioksid<sup>(1)</sup> og magnesiumstearat<sup>(2)</sup> ble sammenblandet i en egnet blander i 10 minutter. Blandingen ble sammenpresset ved anvendelse av en egnet rullepresse og malt ved anvendelse av en egnet mølle  
5 utstyrt med en 30 mesh sil. Croscarmelloseatrium, Pluronic F68 og silisiumdioksid<sup>(3)</sup> ble tilsatt til den malte blanding og blandet videre i 10 minutter. En forblanding ble fremstilt med magnesiumstearat<sup>(4)</sup> og like mengder av blandingen. Forblandingen ble tilsatt til resten av blandingen og innblandet i 5 minutter.  
10 Blandingen ble innkapslet i kapselskall av hard gelatin.

For informasjon vedrørende utforming kan det også vises til US patentsøknader nr. 08/997168 og 60/068387 (innlevert 22. desember 1997).

Referanser

- Alessi, D. R., et.al. (1995). J Biol Chem. 270:27489-27494.
- Barrington, R. E., et.al. (1998). Mol Cell Biol. 18:85-92.
- Bishop, W. R., et.al. (1995). J Biol Chem. 270:30611-30618.
- Campbell, S. L., et.al. (1998). Oncogene. 17:1395-1413.
- Dengler, W.A., et.al. (1995). Anticancer Drugs. 6:522-32.
- Duckworth, B. C., og Cantley, L. C. (1997). J Biol Chem. 272:27665-27670.
- Dudley, D. T., et.al. (1995). Proc Natl Acad Sci USA. 92:7686-7689.
- Favata, M. F., et.al. (1998). J Biol Chem. 273:18623-32.
- Fry, D.W., et.al. (1994). Science. 9:1093-1095.
- Goldstein, N. I., et.al. (1995). Clin Cancer Res. 1:1311-1318.
- Gorczyca et al., (1993) Cancer Res. 53: 1945-51.
- Graham, N. (1995). Exp Opin Ther Patents. 5:1269-1285.
- Gutkind, J. S. (1998). J Biol Chem. 273:1839-1842.
- Heldin, C.H. (1995). Cell. 80:213-23.
- Hung, W. C., og Chaung, L. Y. (1998). Int J Oncol. 12:137-140.
- James, G. L., et.al. (1994). J Biol Chem. 269:27705-27714.
- Kohl, N., et.al. (1995). Nature Medicine. 1:792.
- Kovalenko, M., et.al. (1994). Cancer Res. 54:6106-6114.
- Lebowitz, P. F., et.al. (1997). J Biol Chem. 272:15591-15594.
- Levitzki, A., og A. Gazit. (1995). Science. 267:1782-1788.
- Liu, M., et.al. (1998). Cancer Res. 58:4947-4956.
- Lowy, D. R., og Willumsen, B. (1993) Annu Rev Biochem. 62:851-8091.
- Mendelsohn, J. (1992). J Nat'l Cancer Inst Monogr 13:125-131.
- Moasser, M.M., et.al. (1998). Proc Natl Acad Sci. 95:1369-1374.

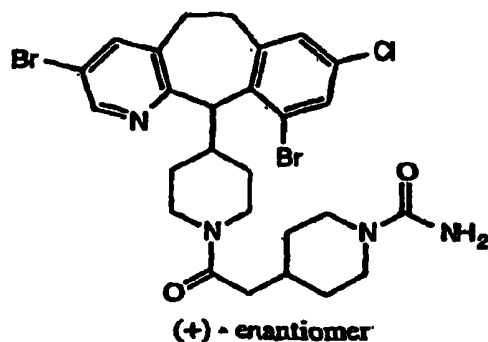
- Monia, B.P., et.al. (1996). Nucleosides and Nucleotides Their Biological Applications-1. Suppl. 34.
- Morrison, D.K., og Cutler, R.E. (1997). Curr Opin Cell Biol. 9:174-179.
- Moyer, J. D., et.al. (1997). Cancer Res. 57: 4838-4848.
- Norgaard, P., et.al. (1999). Clin Cancer Res. 5:35-42.
- Pegram, M.D., et.al. (1998). J Clin Oncol. 16:2659-2671.
- Raff, M. (1998). Nature. 396:119-122.
- Resnicoff, M. (1998). Int J Mol Med. 1:883-888.
- Suzuki, N., et.al. (1998). Proc Natl Acad Sci USA. 95:15356-15361.
- Thornberry, N.A. og Lazebnik, Y. (1998). Science. 281:1312-1316.
- Trahey, M., og McCormick, F. (1987). Science. 238:542-5.
- Wang, H.M., et.al. (1998). Anticancer Res. 18: 2297-2300.
- Whyte, D.B., et.al. (1997). J Biol Chem. 272:14459-14464.
- Zhang, F. L., (1997). J Biol Chem. 272:10232-10239.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Anvendelse av en FPT-inhibitor ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av kreft i en pasient ved administrering av:

(1) en FPT-inhibitor av følgende formel

10



15

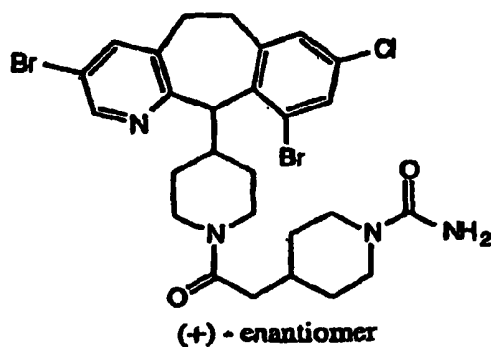
20

og (2) en ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor, i mengder som er effektive til å fremkalle et synergistisk nivå av kreftcelledød.

2. Anvendelse av en FPT-inhibitor ved fremstilling av et  
25 farmasøytisk preparat for regresjon av tumorvolum i en kreft-pasient ved administrering av:

(1) en FPT-inhibitor av følgende formel

30



35

og (2) en ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor, i mengder som er effektive til å fremkalle et synergistisk



nivå av kreftcelledød.

3.     Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori den ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor er  
5     en kinaseinhibitor.
4.     Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvori den ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor inhiberer et element nedstrøms av Ras i Ras-signalreaksjonsveien.  
10
5.     Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvori den ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor er en MEK-inhibitor.
- 15 6.     Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvori den ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor er en vekstfaktorreseptorinhibitor.
- 20 7.     Anvendelse ifølge krav 6, hvori vekstfaktorreseptorinhibitoren er en tyrosinkinaseinhibitor.
8.     Anvendelse ifølge krav 7, hvori tyrosinkinaseinhibitoren er et lite molekyl valgt fra gruppen bestående av (1) en erbB2-reseptorinhibitor, (2) en PDGF-reseptorinhibitor, (3) en  
25 IGF-reseptorinhibitor og (4) en EGF-reseptortyrosinkinaseinhibitor.
9.     Anvendelse ifølge krav 6, hvori vekstfaktorreseptorinhibitoren er et antistoff rettet mot det ekstracellulære  
30 domene av en vekstfaktorreseptor.
10.    Anvendelse ifølge krav 9, hvori antistoffet er et monoklonalt antistoff som rammer erbB2-reseptoren eller et monoklonalt antistoff som rammer EGF-reseptoren.  
35
11.    Anvendelse ifølge krav 9, hvori antistoffet er et monoklonalt antistoff som rammer erbB2-reseptoren.

12. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori FPT-inhibitoren administreres i en mengde på fra 1,4 til 400 mg/dag.

5 13. Anvendelse ifølge krav 12, hvori FPT-inhibitoren administreres i en mengde på fra 3,5 til 70 mg/dag.

14. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori den ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor  
10 administreres i en mengde på fra 1 til 350 mg/dag.

15. Anvendelse ifølge krav 14, hvori den ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor administreres i en mengde på fra 3,5 til 70 mg/dag.

15

16. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori angitte FPT-inhibitor, og angitte ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor administreres samtidig.

20 17. Anvendelse ifølge krav 1 til 15, hvori angitte FPT-inhibitor, og angitte ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor administreres sekvensvis.

18. Anvendelse ifølge krav 17, hvori angitte ytterligere Ras-signalreaksjonsveihinhibitor administreres først.  
25

19. Anvendelse ifølge krav 17, hvori angitte FPT-inhibitor administreres først.

30 20. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori kreften er: lungekreft, pankreatisk kreft, tykktarmskreft, ovariekreft, kreft i leveren, myeloid leukemi, melanom, tyreoidfollikulær kreft, blærekarzinom, gliom, myelodysplastisk syndrom, brystkreft eller prostatakreft.

35

21. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori angitte behandling ytterligere omfatter administrering av et kjemoterapeutisk middel.

22. Anvendelse ifølge krav 21, hvori angitte kjemoterapeutiske middel er valgt fra: uracilsennep, klormetin, syklofosfamid, ifosfamid, melfalan, klorambucil, pipobroman, trietylenmelamin, trietylentiofosforamin, busulfan, carmustin, lomustin, streptozocin, dakarbazin, temozolomid, metotreksat, 5-fluoruracil, floksuridin, cytarabin, 6-merkaptopurin, 6-tioguanin, fludarabinfosfat, pentostatin, gemcitabin, vinblastin, vinkristin, vindesin, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doksorubicin, epirubicin, idarubicin, paclitaxel, mitramycin, deoksykoformycin, mitomycin-C, L-asparaginase, interferoner, etoposid, teniposid, 17 $\alpha$ -etynyløstradiol, diethylstilbestrol, testosteron, prednison, fluoksymesteron, dromostanolonpropionat, testolakton, megestrolacetat, tamoksifen, metylprednisolon, metyltestosteron, prednisolon, triamcinolon, klortrianisen, hydroksyprogesteron, aminoglutetimid, estramustin, medroksyprogesteronacetat, leuprolid, flutamid, toremifen, goserelin, cisplatin, karboplatin, hydroksyurea, amsakrin, prokarbazin, mitotan, mitoksantron, levamisol, navelben, CPT-11, anastrozol, letrazol, kapecitabin, reloksafin, droloksafin, gemcitabin, paclitaxel og heksametylmelamin.

23. Anvendelse ifølge krav 21, hvori angitte antineoplastiske middel er temozolomid.

24. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori behandlingen ytterligere omfatter administrering av bestråling.

25. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori kreftcelledød finner sted via apoptose.

# RAS-SIGNALOVERFØRING

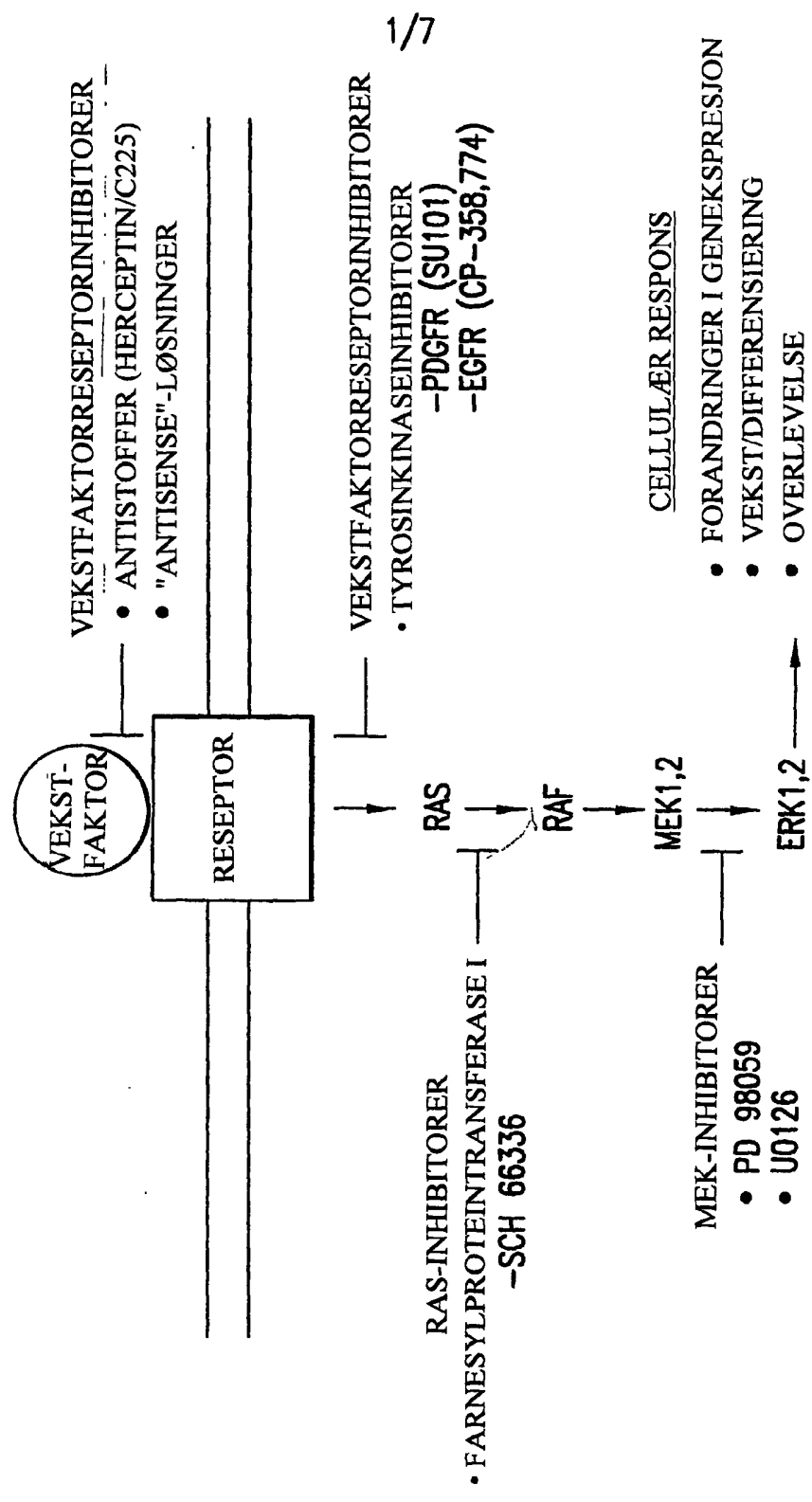
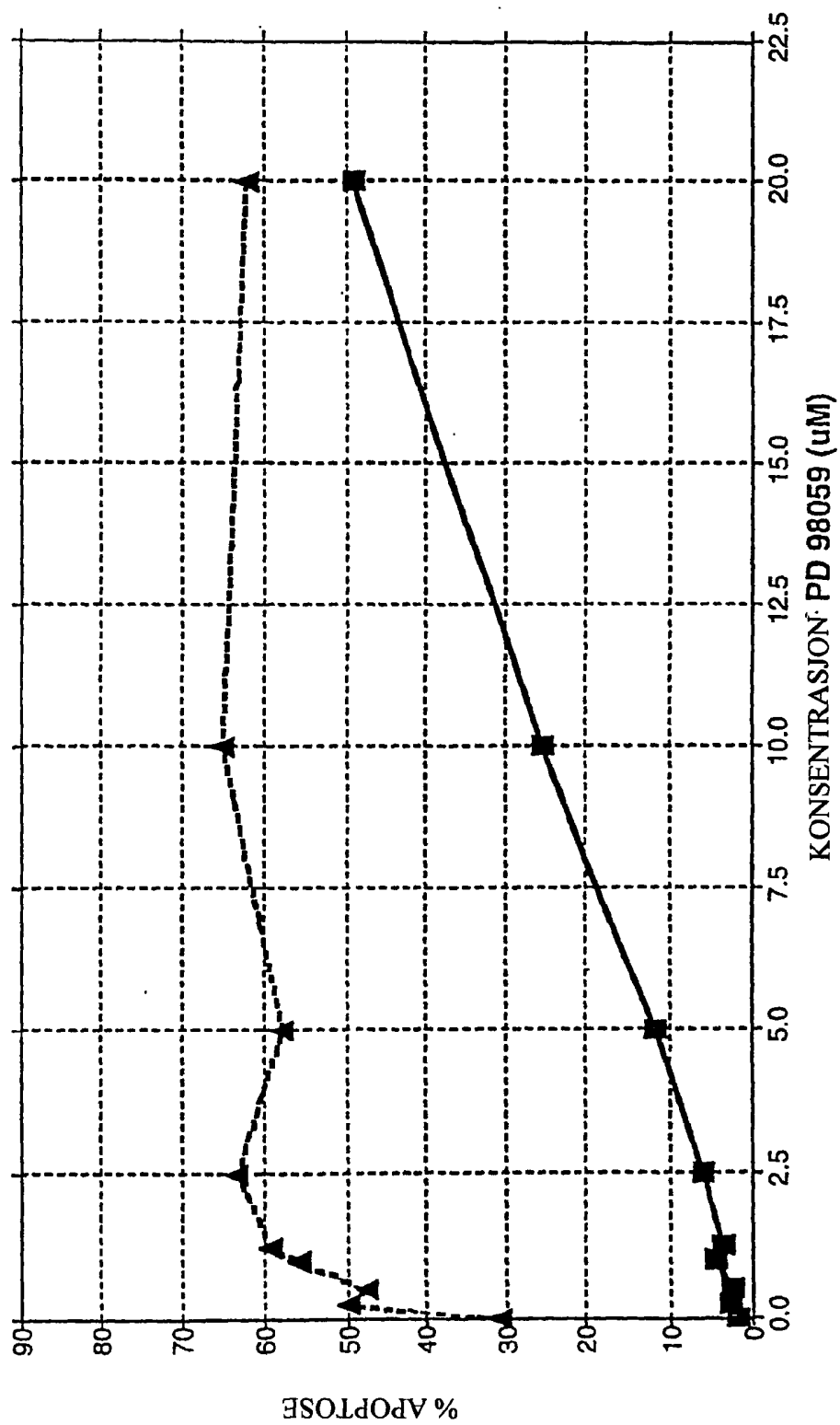


FIG.1



■ PD 98059

▲ PD 98059 + SCH 66336

FIG. 2

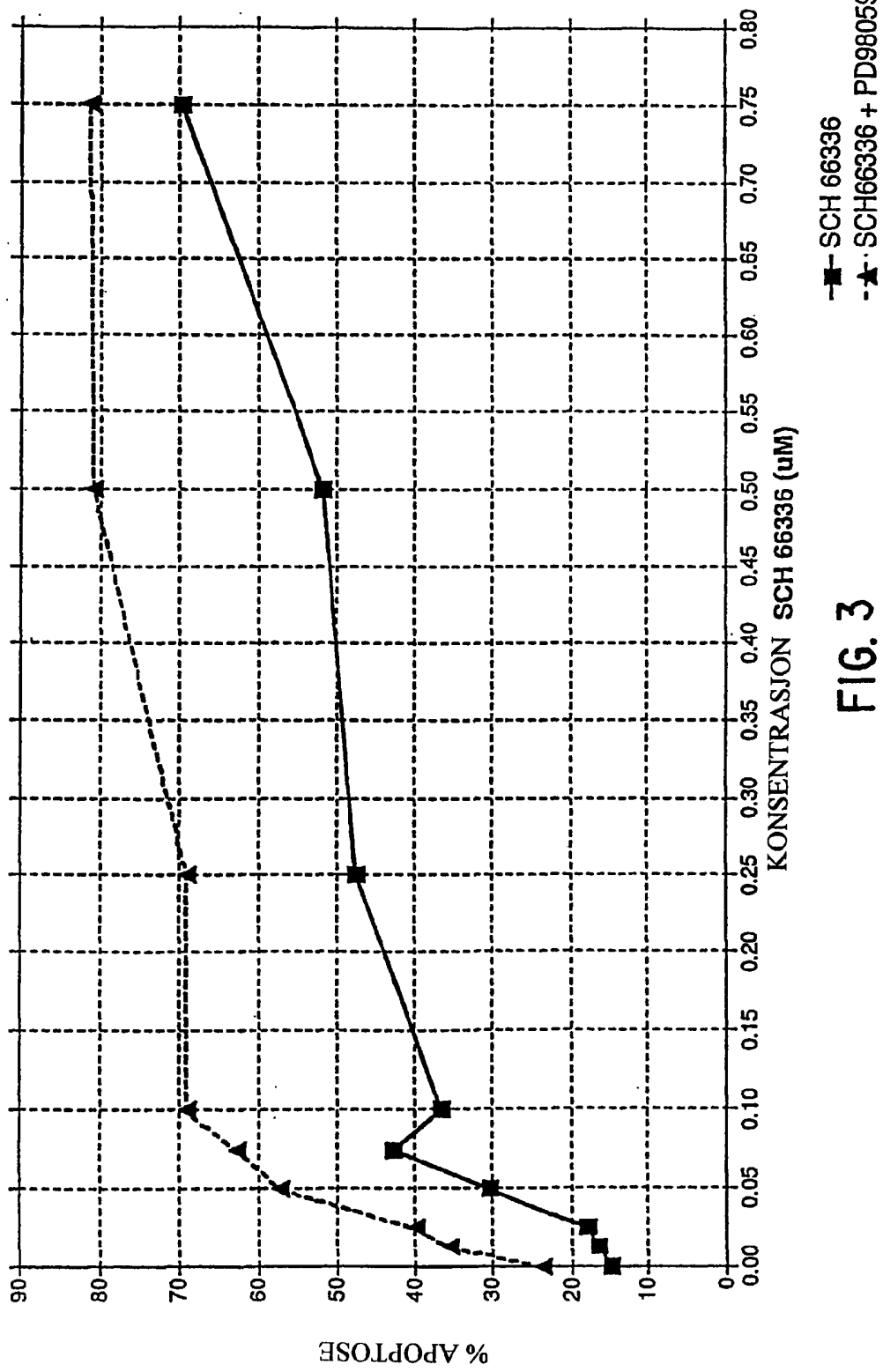


FIG. 3

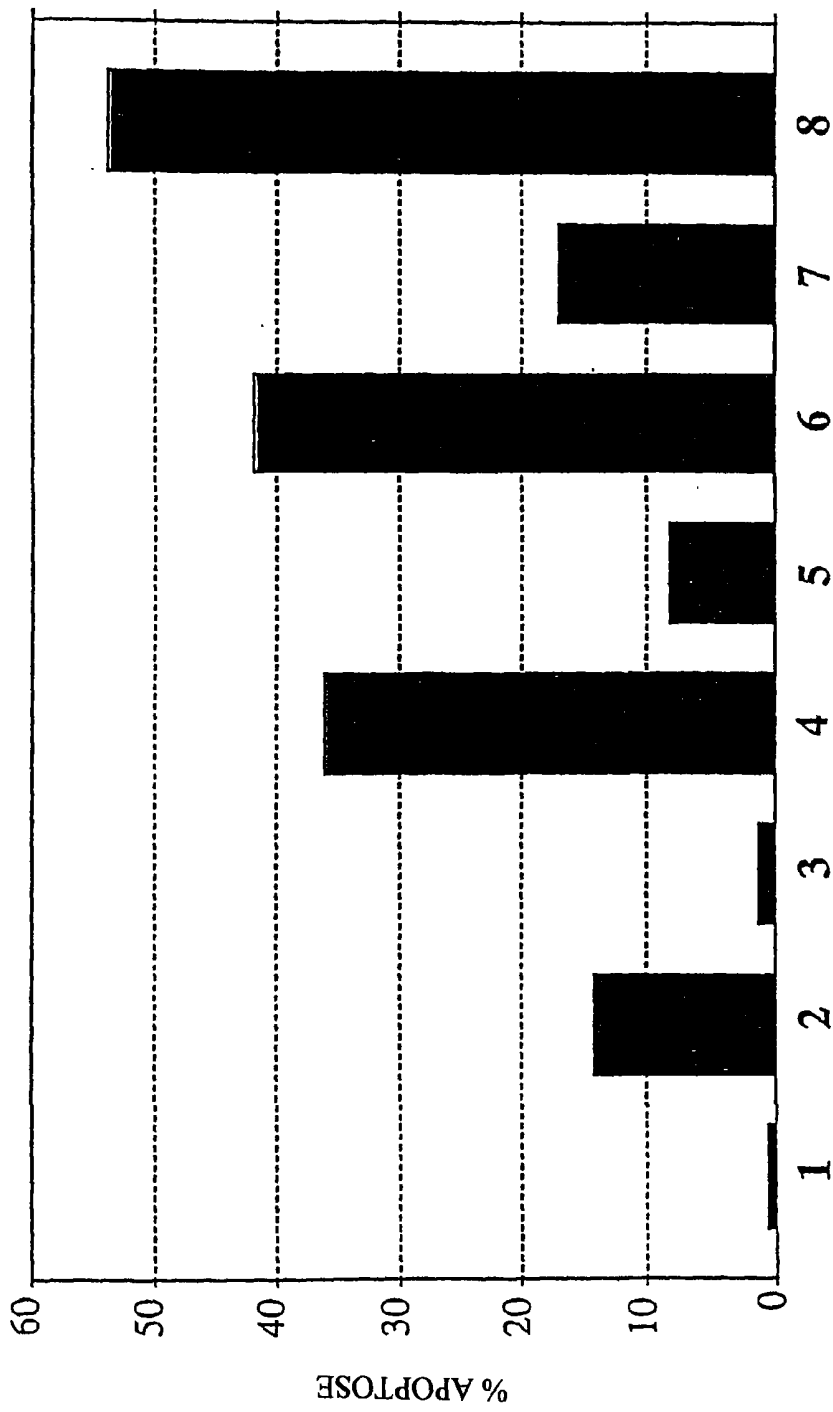


FIG.4

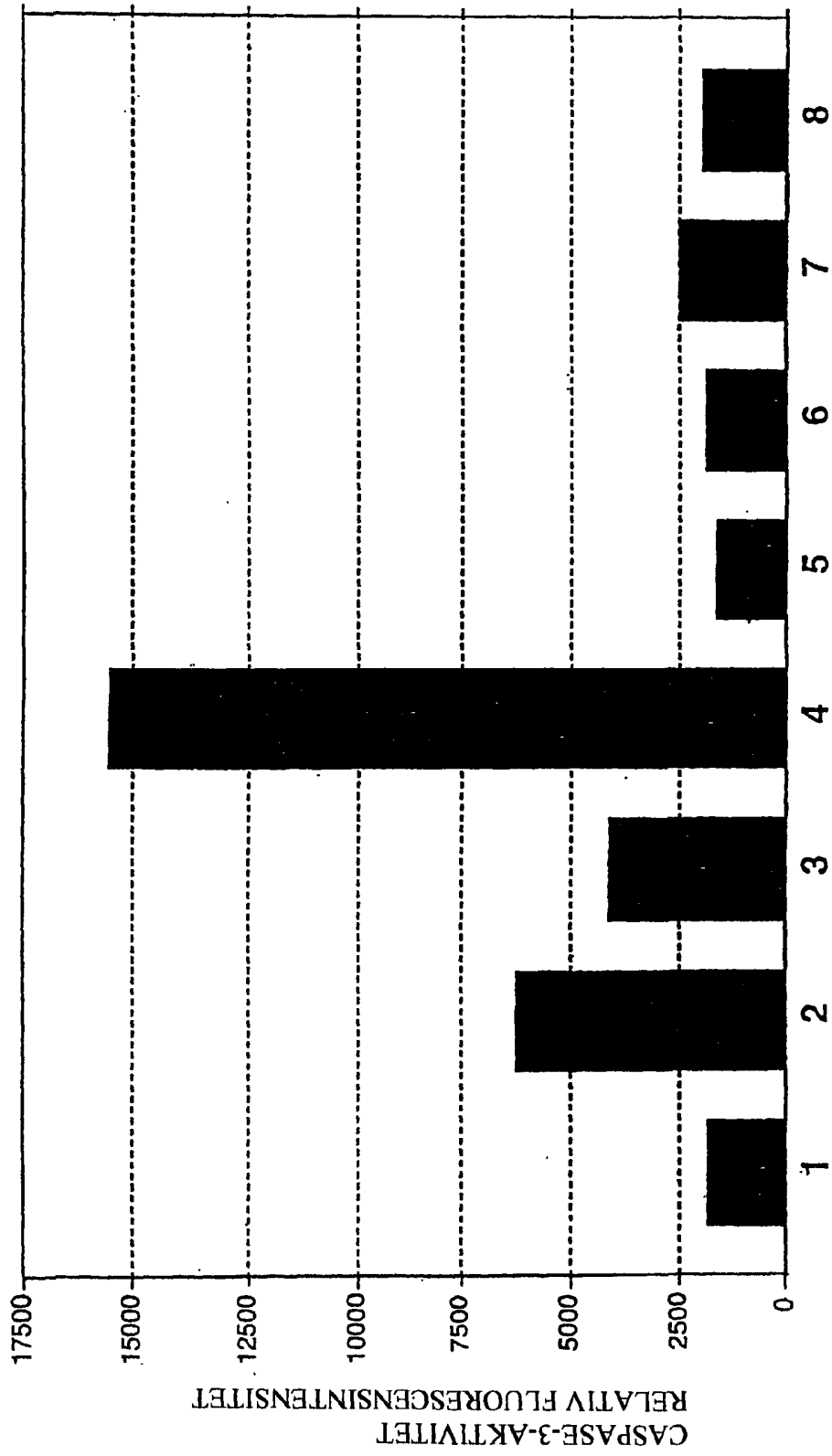
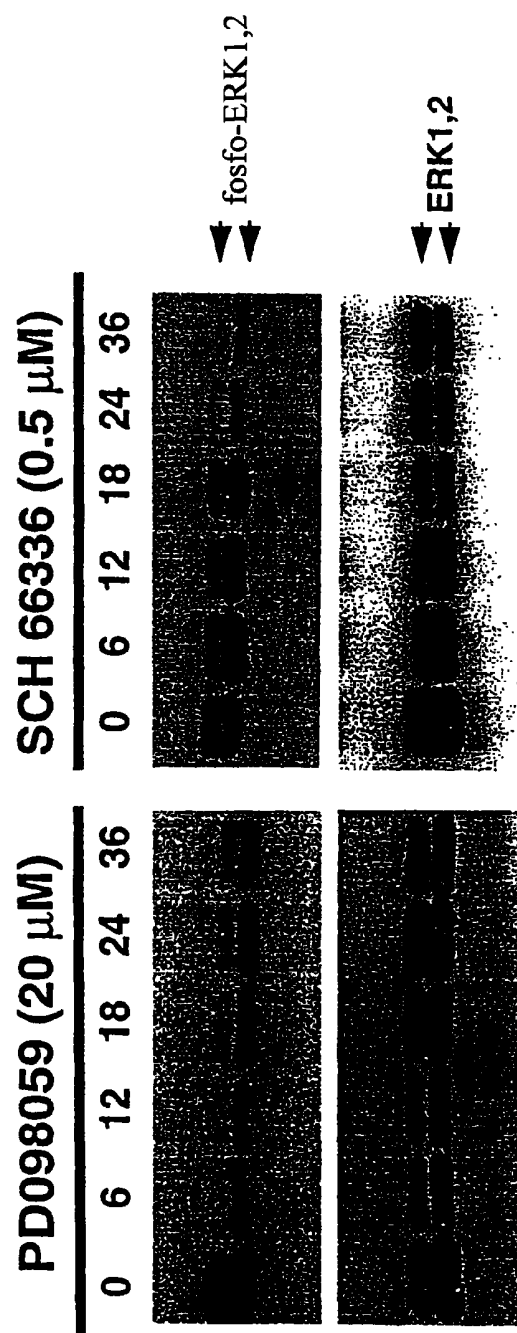


FIG.5





**FIG.6**

# RAS-SIGNALOVERFØRING

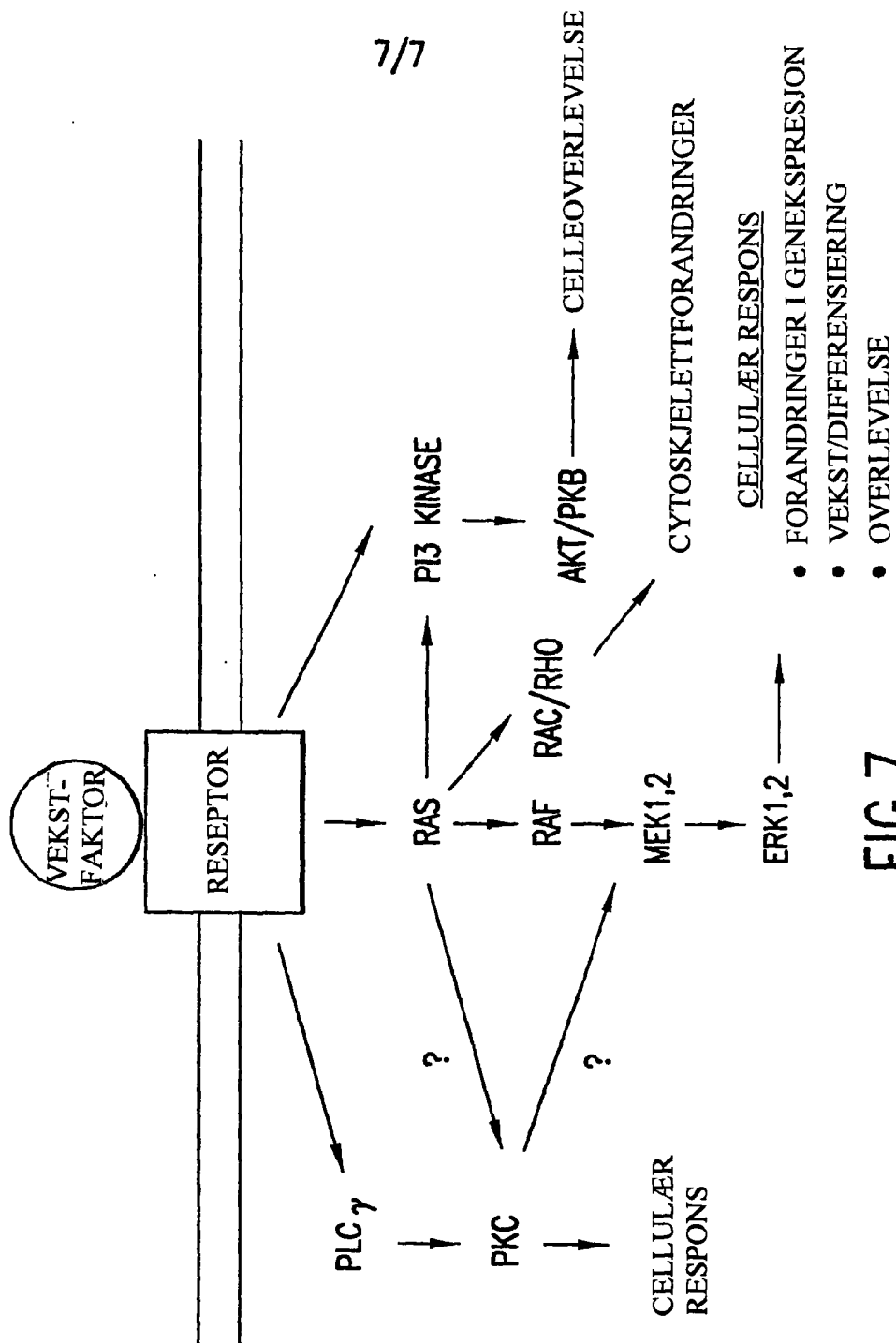


FIG.7