

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3490560

a nome: Janssen Pharmaceutica, N.V.

a: 2340 Beerse - BELGIO

dal titolo: Niraparib per l'uso in un metodo di trattamento di cancro della prostata.

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda niraparib o un sale di esso per l'uso in un metodo di trattamento di cancro della prostata in un essere umano che necessita di tale trattamento comprendente somministrare all'essere umano una quantità terapeuticamente efficace di niraparib, in cui l'essere umano è portatore di almeno un'anomalia di riparazione del DNA selezionata dal gruppo consistente in BRCA-1 e BRCA-2.

Sfondo dell'invenzione

Gras, Jordi, *Drugs of the Future*, Prous Science, (2013), vol. 38, n. 10, concerne la sintesi e la farmacologia di niraparib cloridrato, un inibitore di poli[ADP-ribosio]polimerasi (PARP). Michie, Caroline O., et al., *Journal of Clinical Oncology*, (2013), vol. 31, n. 15, concerne i "Final results of the phase I trial of niraparib (MK4827), a poly(ADP)ribose polymerase (PARP) inhibitor incorporating proof of concept biomarker studies and expansion cohorts involving BRCA1/2 mutation carriers, sporadic ovarian, and castration resistant prostate cancer (CRPC)." ("Risultati finali della sperimentazione di fase I di niraparib (MK4827), un inibitore di poli(ADP)ribosio polimerasi (PARP) che incorpora studi di biomarcatori di prova di concetto e coorti di espansione che coinvolgono

portatori di mutazioni BRCA1/2, cancro ovarico sporadico, e della prostata resistente a castrazione (CRPC)."). Jones, Philip, et al., J. Med. Chem., (2009), vol. 52, n. 22, concerne "the development of a novel series of 2-phenyl-2H-indazole-7-carboxamides as poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 1 and 2 inhibitors." ("lo sviluppo di una serie innovativa di 2-fenil-2H-indazol-7-carbossammidi come inibitori di poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARP) 1 e 2").

Il cancro della prostata è il tumore maligno non cutaneo più comune negli uomini e la seconda principale causa di morte per cancro negli uomini nel mondo occidentale. Il cancro della prostata risulta dalla crescita incontrollata di cellule anomale nella ghiandola prostatica. Una volta che si sviluppa un cancro della prostata, gli androgeni, come il testosterone, favoriscono la crescita del tumore di cancro della prostata. Nei suoi stadi iniziali, il cancro della prostata localizzato è spesso trattato con terapia locale includente, per esempio, una rimozione chirurgica della ghiandola prostatica e radioterapia. Tuttavia, quando la terapia locale non riesce a curare il cancro della prostata, come accade in fino a un terzo degli uomini, la malattia progredisce a una malattia metastatica incurabile (cioè una malattia in cui il cancro si è diffuso da una parte del corpo ad altre parti).

Trattamento di cancro della prostata metastatico La terapia di deprivazione androgenica ("ADT", Androgen Deprivation Therapy) o terapia di soppressione degli androgeni è svolta per ridurre la produzione testicolare di testosterone. La ADT include la castrazione chirurgica (orchiectomia) o l'uso di antagonisti o agonisti dell'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante ("LHRH", Luteinizing Hormone-Releasing Hormone). Esempi di antagonisti di LHRH includono degarelix. Esempi di agonisti di LHRH includono goserelina acetato, istrelina acetato, leuprolide acetato, e triptorelina palmoato.

Abiraterone acetato è un profarmaco di abiraterone, inibisce 17α -idrossilasi/C17,20-liasi (citocromo P450c17 [CYP17]), un enzima chiave nella biosintesi degli androgeni. Abiraterone acetato in combinazione con prednisone è stato approvato per il trattamento di uomini con cancro della prostata metastatico resistente a castrazione ("mCRPC", metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer) che hanno ricevuto antecedente chemioterapia contenente docetaxel. L'efficacia e sicurezza di una terapia con abiraterone acetato (dose giornaliera di compresse di 1.000 mg) e prednisone (5 mg due volte al giorno) in pazienti con mCRPC sono stabilite dai risultati degli studi COU-AA-301 e COU-AA-302, entrambi di Fase 3, multinazionali, randomizzati, in doppio cieco, controllati con placebo. Lo studio COU-AA-301 è stato il primo studio di Fase 3 a dimostrare che un ulteriore abbassamento delle concentrazioni di testosterone al di sotto di quelle conseguite con terapia di deprivazione androgenica ("ADT") usando un'inibizione di CYP17 con abiraterone acetato migliora la sopravvivenza in pazienti con mCRPC. Lo studio COU-AA-302 ha dimostrato una sopravvivenza complessiva ("OS", Overall Survival) significativamente migliorata e una sopravvivenza priva di progressione radiografica ("rPFS", radiographic Progression-Free Survival) in pazienti naïve a chemioterapia con mCRPC trattato con abiraterone acetato più prednisone in confronto a placebo più prednisone. Ciò che è necessario sono dati per determinare se abiraterone acetato in combinazione con prednisone a bassa dose e ADT sia superiore alla sola ADT nel migliorare rPFS e OS in soggetti con mHNPC con fattori prognostici di alto rischio.

Dunque, il trattamento di cancro della prostata, incluso cancro della prostata resistente a castrazione e cancro della prostata resistente a castrazione metastatico, per mezzo di inibizione di PARP con niraparib in pazienti con mCRPC, inclusi quelli con anomalie di riparazione del DNA. Questo trattamento può seguire

una chemioterapia o può essere un soggetto chemio-naïve. Questo trattamento può seguire agenti mirati ad AR, ad es. enzalutammide, apalutammide, e bicalutammide. Pertanto, niraparib può presentare un'altra opzione di trattamento.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione è diretta a niraparib o un sale di esso per l'uso in un metodo di trattamento di cancro della prostata in un essere umano che necessita di tale trattamento comprendente somministrare all'essere umano una quantità terapeuticamente efficace di niraparib, in cui l'essere umano è portatore di almeno un'anomalia di riparazione del DNA selezionata dal gruppo consistente in BRCA-1 e BRCA-2.

In una forma di realizzazione, il cancro della prostata è cancro della prostata resistente a castrazione ("CRPC"), cancro della prostata resistente a castrazione metastatico, e/o cancro della prostata resistente agli antiandrogeni.

Nell'invenzione, l'essere umano è portatore di almeno un'anomalia di riparazione del DNA selezionata dal gruppo consistente in BRCA-1 e BRCA-2. In un'altra forma di realizzazione l'essere umano è portatore anche di almeno un'anomalia di riparazione del DNA selezionata dal gruppo consistente in BRCA-1, BRCA-2, FANCA, PALB2, CHEK2, BRIP1, HDAC2, e ATM.

In un'altra forma di realizzazione, l'essere umano è portatore di almeno un'anomalia di riparazione del DNA che è BRCA-1 o BRCA-2.

In un'altra forma di realizzazione, all'essere umano è somministrato niraparib in una quantità, preferibilmente, da circa 30 mg/giorno a circa 400 mg/giorno, più preferibilmente 300 mg/giorno, e in maniera massimamente preferibile una somministrazione orale una volta al giorno in tre forme di dosaggio orale da 100 mg.

In un'altra forma di realizzazione, la presente invenzione è diretta a una

composizione comprendente niraparib o un sale per l'uso nel trattamento di cancro della prostata, cancro della prostata resistente agli antiandrogeni, cancro della prostata resistente a castrazione, e cancro della prostata resistente a castrazione metastatico.

Breve descrizione dei disegni

Figura 1. Illustra che niraparib inibisce la crescita di linee di cellule di tumore della prostata umano in vitro.

Figura 2. Illustra che niraparib sopprime la formazione di PAR in due linee di cellule di tumore della prostata umano in vitro.

Figura 3. Illustra che un trattamento con niraparib induce γ -H2AX aumentato in cellule 22RV1 in una maniera dose-dipendente, come misurato mediante citometria a flusso.

Figura 4. Illustra che niraparib induce γ -H2AX in cellule 22RV1, LNCaP AR-TB, e C4-2B in vitro.

Figura 5. Illustra che un trattamento con niraparib inibisce una crescita di tumori della prostata C4-2B-luc in topi maschi NSG.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il termine "soggetto" si riferisce a un mammifero, in maniera massimamente preferibile un essere umano, che è stato o è oggetto di trattamento, osservazione o esperimento.

Il termine "trattamento" si riferisce al trattamento di un soggetto affetto da una condizione patologica e si riferisce a un effetto che allevia la condizione uccidendo le cellule cancerose, ma anche a un effetto che dà come risultato l'inibizione della progressione della condizione, e include una riduzione del tasso di progressione, un arresto del tasso di progressione, miglioramento della condizione, e cura della

condizione. È incluso anche il trattamento come misura profilattica (cioè profilassi).

L'espressione "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce a una quantità di niraparib che suscita la risposta biologica o medicinale in un sistema di tessuto che è cercata da un ricercatore, veterinario, medico o altro clinico, che include l'alleviamento o alleviamento parziale dei sintomi della malattia, sindrome, condizione, o disturbo che viene trattato.

L'espressione "quantità sicura ed efficace" si riferisce a una quantità di niraparib che suscita un impedimento o apporto di miglioria di una progressione della malattia e una tossicità accettabile nell'essere umano.

Il termine "composizione" si riferisce a un prodotto farmaceutico che include gli ingredienti specificati talvolta in quantità terapeuticamente efficaci, come anche qualsiasi prodotto che risulti, direttamente o indirettamente, da combinazioni degli ingredienti specificati nelle quantità specificate.

L'espressione "farmaceuticamente accettabile" come usato nel presente contesto pertiene a composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono, nell'ambito di un fondato giudizio medico, idonei per l'uso a contatto con i tessuti di un essere umano senza eccessiva tossicità, irritazioni, risposta allergica, o altro problema o complicanza, commisurati a un ragionevole rapporto benefici/rischi. Ciascun veicolante, eccipiente, ecc. deve essere "accettabile" nel senso che deve essere compatibile con gli altri ingredienti della formulazione.

L'espressione "recettore degli androgeni" come usato nel presente contesto è intesa includere il recettore degli androgeni di tipo selvatico nonché AR resistenti ad androgeni e/o mutanti di AR associati a cancro della prostata resistente a castrazione.

Come usato nel presente contesto, il termine "antiandrogeno" si riferisce a

un gruppo di composti antagonisti di recettori di ormoni che è capace di impedire o inibire gli effetti biologici di androgeni su tessuti normalmente reattivi nel corpo. In alcune forme di realizzazione, un antiandrogeno è una piccola molecola. Gli antiandrogeni includono enzalutammide, apalutammide, e abiraterone acetato.

Come usato nel presente contesto, l'espressione "antiandrogeno di prima generazione" si riferisce a un agente che esibisce attività di antagonista contro un polipeptide di AR di tipo selvatico. Tuttavia, gli antiandrogeni di prima generazione differiscono dagli antiandrogeni di seconda generazione in quanto gli antiandrogeni di prima generazione possono potenzialmente fungere da agonisti nel CRPC. Antiandrogeni di prima generazione esemplificativi includono, ma non sono limitati a, flutammide, nilutammide e bicalutammide.

Come usato nel presente contesto, l'espressione "antiandrogeno di seconda generazione" si riferisce a un agente che esibisce piena attività di antagonista contro un polipeptide di AR di tipo selvatico. Gli antiandrogeni di seconda generazione differiscono dagli antiandrogeni di prima generazione in quanto gli antiandrogeni di seconda generazione fungono da pieni antagonisti in cellule esprimenti livelli elevati di AR, come per esempio, nel CRPC. Antiandrogeni di seconda generazione esemplificativi includono 4-[7-(6-ciano-5-trifluorometilpiridin-3-il)-8-osso-6-tiosso-5,7-diazaspiro[3.4]ott-5-il]-2-fluoro-N-metilbenzammide (nota anche come ARN-509; n. CAS 956104-40-8); 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-osso-2-tiossoimidazolidin-1-il)-2-fluoro-N-metilbenzammide (nota anche come MDV3100 o enzalutammide; n. CAS: 915087-33-1) e RD162 (n. CAS 915087-27-3). In alcune forme di realizzazione, un antiandrogeno di seconda generazione si unisce a un polipeptide di AR in corrispondenza di o vicino al sito di unione di ligando del polipeptide di AR.

Come usato nel presente contesto, l'espressione "antiandrogeno di terza generazione" si riferisce a un agente che esibisce piena attività antagonista contro un polipeptide di AR di tipo selvatico e contro forme mutanti del polipeptide di AR, con mutazioni che si originano nel dominio di unione a ligando (LBD, Ligand Binding Domain) del polipeptide di AR come esposto nel seguito. Gli antiandrogeni di terza generazione ritengono la differenziazione dagli antiandrogeni di prima generazione in quanto gli antiandrogeni di terza generazione fungono da pieni antagonisti in cellule esprimenti livelli elevati di AR, come per esempio, in CRPC.

Come usato nel presente contesto, il termine "mutante" si riferisce a un acido nucleico o polipeptide alterato (in confronto a un riferimento), o a una cellula od organismo contenente o esprime tale acido nucleico o polipeptide alterato.

Come usato nel presente contesto, salvo altrimenti notato, il termine "influenzare" o "influenzato" (quando ci si riferisce a una malattia, sindrome, condizione o disturbo che è influenzato da antagonismo di AR) include una riduzione della frequenza e/o gravità di uno o più sintomi o manifestazioni di detta malattia, sindrome, condizione o disturbo; e/o include l'impedimento dello sviluppo di uno o più sintomi o manifestazioni di detta malattia, sindrome, condizione o disturbo o lo sviluppo della malattia, condizione, sindrome o disturbo.

Forme di realizzazione della presente invenzione includono profarmaci di niraparib. In generale, tali profarmaci sono derivati funzionali dei composti che sono prontamente convertibili *in vivo* nel composto richiesto. Dunque, nella presente invenzione, il termine "somministrare" ingloba il trattamento o impedimento delle varie malattie, condizioni, sindromi e disturbi descritti con il composto specificamente divulgato o con un composto che può non essere specificamente divulgato, ma che si converte nel composto specificato *in vivo*

dopo una somministrazione a un paziente. Procedure convenzionali per la selezione e preparazione di derivati di profarmaco idonei sono descritte, per esempio, in "Design of Prodrugs", a cura di H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Recettore degli androgeni (AR)

Gli androgeni si uniscono a uno specifico recettore, il recettore degli androgeni (AR), dentro le cellule di tessuti bersaglio. L'AR è espresso in numerosi tessuti del corpo ed è il recettore attraverso il quale sono espressi gli effetti fisiologici come anche patofisiologici dei ligandi endogeni degli androgeni, come testosterone (T) e diidrotestosterone (DHT). Strutturalmente, l'AR è composto da tre domini funzionali principali: il dominio di unione a ligando (LBD), il dominio di unione a DNA, e il dominio amminoterminale. A un composto che si unisce all'AR e imita gli effetti di un ligando di AR endogeno ci si riferisce come agonista di AR, laddove un composto che inibisce gli effetti di un ligando di AR endogeno è chiamato antagonista di AR. L'unione di un androgeno al recettore lo attiva e lo fa unire a siti di unione a DNA adiacenti a geni bersaglio. Da lì, esso interagisce con proteine co-attivatrici e fattori di trascrizione di base per regolare l'espressione del gene. Dunque, tramite il loro recettore, gli androgeni causano cambiamenti nell'espressione di geni nelle cellule. Questi cambiamenti hanno in ultima analisi conseguenze sulla produzione metabolica, sulla differenziazione o sulla proliferazione della cellula, che sono visibili nella fisiologia del tessuto bersaglio. Nella prostata, gli androgeni stimolano la crescita del tessuto della prostata e di cellule di cancro della prostata mediante unione all'AR che è presente all'interno del citoplasma di tessuto sensibile ad androgeni.

I composti che modulano selettivamente un AR sono di importanza clinica nel trattamento di o impedimento di una varietà di malattie, condizioni, e tumori, inclusi, ma non limitati a, cancro della prostata, iperplasia prostatica

benigna, irsutismo nelle donne, alopecia, anoressia nervosa, cancro della mammella, acne, condizioni muscoloscheletriche, come malattia delle ossa, condizioni ematopoietiche, malattia neuromuscolare, malattia reumatologica, cancro, AIDS, cachessia, per terapia ormonale sostitutiva (TOS), impiegati nella contraccezione maschile, per il potenziamento delle prestazioni maschili, per condizioni riproduttive maschili, e ipogonadismo maschile primario o secondario.

Cancro della prostata resistente a castrazione

Gli agenti che bloccano l'azione (antiandrogeni) di ormoni endogeni (ad es. testosterone) sono altamente efficaci e usati di routine per il trattamento di cancro della prostata (terapia di ablazione di androgeni). Sebbene inizialmente efficaci nel sopprimere la crescita di tumore, queste terapie di ablazione di androgeni alla fine falliscono in quasi tutti i casi, conducendo a CRPC. La maggior parte delle cellule di cancro della prostata, ma non tutte, rispondono inizialmente a terapia di ritiro degli androgeni. Tuttavia, con il tempo, emergono popolazioni sopravvissute di cellule di cancro della prostata perché esse hanno risposto alla pressione selettiva creata dalla terapia di soppressione degli androgeni e ora sono refrattarie a essa. Non soltanto il cancro primario è refrattario alle terapie disponibili, ma le cellule di cancro possono anche distaccarsi dal tumore primario e viaggiare nel flusso sanguigno, diffondendo la malattia a siti distanti (specialmente l'osso). Questo è noto come cancro della prostata resistente a castrazione metastatico ("mCRPC"). Tra altri effetti, ciò causa un dolore significativo e un'ulteriore fragilità delle ossa nel soggetto.

In alcune forme di realizzazione, il cancro della prostata del soggetto è resistente a o non reattivo a trattamento antiandrogeni, per esempio un trattamento che include, ma non limitato a, enzalutammide, apalutammide e

abiraterone acetato ("resistenza ad antiandrogeni").

La preparazione di niraparib, 2-[4-[(3S)-piperidin-3-il]fenil]indazol-7-carbossammide, può essere trovata nel brevetto U.S. n. 8.071.623, rilasciato il 6 dicembre 2011 e intitolato Amide Substituted Indazoles as Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) Inhibitors, che rivendica il beneficio della domanda di brevetto provvisoria U.S. n. 60/921.310, depositata il 16 febbraio 2010, nonché nel brevetto U.S. n. 8.436.185, rilasciato il 7 maggio 2013 e intitolato Pharmaceutically Acceptable Salts of 2-[4-[(3S)-piperidin-3-yl]phenyl]-2H-indazole-7-carboxamide, che rivendica il beneficio della domanda di brevetto provvisoria U.S. n. 61/010.333 depositata l'8 gennaio 2008.

Il niraparib o un sale per l'uso secondo le rivendicazioni possono essere forniti sotto forma di composizioni farmaceutiche comprendenti niraparib o un sale e un veicolante farmaceuticamente accettabile. Le composizioni farmaceutiche contenenti l'ingrediente attivo possono essere in una forma idonea per uso orale, per esempio, come compresse, troche, pasticche, sospensioni acquose od oleose, polveri o granuli disperdibili, emulsioni, capsule dure o molli, o sciroppi o elisir.

Le composizioni intese per l'uso orale possono essere preparate secondo qualsiasi metodo noto nell'arte per la fabbricazione di composizioni farmaceutiche e tali composizioni possono contenere uno o più agenti selezionati dal gruppo consistente in agenti dolcificanti, agenti aromatizzanti, agenti coloranti e agenti conservanti al fine di fornire preparazioni farmaceuticamente eleganti e gradevoli al palato. Le compresse contengono l'ingrediente attivo in mescolanza con eccipienti farmaceuticamente accettabili atossici che sono idonei per la fabbricazione di compresse. Questi eccipienti possono essere per esempio diluenti inerti, come carbonato di calcio, carbonato di sodio, lattosio, fosfato di calcio o fosfato di sodio;

agenti granulanti e disgreganti, per esempio, cellulosa microcristallina, croscarmellosa sodica, amido di mais, o acido alginico; agenti di unione, per esempio amido, gelatina, polivinilpirrolidone o acacia, e agenti lubrificanti, per esempio, stearato di magnesio, acido stearico o talco. Le compresse possono essere non rivestite o possono essere rivestite mediante tecniche note per mascherare il sapore sgradevole del farmaco o ritardare disintegrazione e assorbimento nel tratto gastrointestinale e fornire in tal modo un'azione prolungata per un periodo di tempo più lungo. Per esempio, può essere impiegato un materiale idrosolubile di mascheramento del sapore come idrossipropilmetilcellulosa o idrossipropilcellulosa, o un materiale di ritardo del tempo come etilcellulosa o acetato butirrato di cellulosa.

Le formulazioni per uso orale possono anche essere presentate come capsule di gelatina dura in cui l'ingrediente attivo è miscelato con un diluente solido inerte, per esempio, carbonato di calcio, fosfato di calcio o caolino, o come capsule di gelatina morbida in cui l'ingrediente attivo è miscelato con veicolante idrosolubile come polietilenglicole o un mezzo di olio, per esempio olio di arachidi, paraffina liquida, od olio di oliva.

Le sospensioni acquose contengono il materiale attivo in mescolanza con eccipienti idonei per la fabbricazione di sospensioni acquose. Tali eccipienti sono agenti sospensivanti, per esempio carbosimetilcellulosa di sodio, metilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, alginato di sodio, polivinilpirrolidone, gomma adragante e gomma di acacia; agenti disperdenti o bagnanti possono essere un fosfatide presente in natura, per esempio lecitina, o prodotti di condensazione di un alchilenoossido con acidi grassi, per esempio poliossietilenstearato, o prodotti di condensazione di etilenoossido con alcoli alifatici a catena lunga, per esempio eptadecaetilenossicetaneale, o prodotti di condensazione di etilenoossido con esteri

parziali derivati da acidi grassi e un esitolio come poliossietilensorbitolo monooleato, o prodotti di condensazione di etilenossido con esteri parziali derivati da acidi grassi e anidridi di esitolio, per esempio polietilensorbitano monooleato. Le sospensioni acquose possono contenere anche uno o più conservanti, per esempio etil- o n-propil-p-idrossibenzoato, uno o più agenti coloranti, uno o più agenti aromatizzanti, e uno o più agenti dolcificanti, come saccarosio, saccarina o aspartame.

Le sospensioni oleose possono essere formulate sospendendo l'ingrediente attivo in un olio vegetale, per esempio olio di arachidi, olio di oliva, olio di sesamo od olio di cocco, o in olio minerale come paraffina liquida. Le sospensioni oleose possono contenere un agente addensante, per esempio cera d'api, paraffina dura o alcol cetilico. Agenti dolcificanti come quelli sopra esposti, e agenti aromatizzanti possono essere addizionati per fornire una preparazione orale gradevole al palato. Queste composizioni possono essere conservate mediante l'aggiunta di un antiossidante come idrossianisolo butilato o alfa-tocoferolo.

Polveri e granuli disperdibili idonei per una preparazione di una sospensione acquosa mediante l'aggiunta di acqua forniscono l'ingrediente attivo in mescolanza con un agente disperdente o bagnante, un agente sospensivante e uno o più conservanti. Agenti disperdenti o bagnanti e agenti sospensivanti idonei sono esemplificati da quelli già menzionati sopra. Possono essere presenti anche altri eccipienti, per esempio agenti dolcificanti, aromatizzanti e coloranti. Queste composizioni possono essere conservate mediante l'aggiunta di un antiossidante come acido ascorbico.

Le composizioni farmaceutiche possono anche essere sotto forma di un'emulsione olio in acqua. La fase oleosa può essere un olio vegetale, per esempio olio di oliva od olio di arachidi, o un olio minerale, per esempio paraffina

liquida o miscele di questi. Agenti emulsionanti idonei possono essere fosfatidi presenti in natura, per esempio lecitina di soia, ed esteri o esteri parziali derivati da acidi grassi e anidridi di esitolo, per esempio sorbitano monooleato, e prodotti di condensazione di detti esteri parziali con etilenossido, per esempio poliossietilensorbitano monooleato. Le emulsioni possono contenere anche agenti dolcificanti, aromatizzanti, conservanti e antiossidanti.

Sciroppi ed elisir possono essere formulati con agenti dolcificanti, per esempio glicerolo, propilenglicole, sorbitolo o saccarosio. Tali formulazioni possono anche contenere un emolliente, un conservante, agenti aromatizzanti e coloranti e antiossidante. Le composizioni farmaceutiche possono essere sotto forma di una soluzione acquosa iniettabile sterile. Tra i veicoli e i solventi accettabili che possono essere impiegati vi sono acqua, soluzione di Ringer e soluzione isotonica di cloruro di sodio.

La preparazione iniettabile sterile può anche essere una microemulsione olio in acqua iniettabile sterile ove l'ingrediente attivo è dissolto nella fase oleosa. Per esempio, l'ingrediente attivo può essere dapprima dissolto in una miscela di olio di soia e lecitina. La soluzione di olio quindi introdotta in una miscela di acqua e glicerolo e lavorata per formare una microemulsione.

Le soluzioni o microemulsioni iniettabili possono essere introdotte nel flusso sanguigno di un paziente mediante iniezione locale in bolo. Alternativamente, può essere vantaggioso somministrare la soluzione o microemulsione in modo tale da mantenere una concentrazione circolante costante del composto in questione. Al fine di mantenere tale concentrazione costante, può essere utilizzato un dispositivo di erogazione endovenosa continua. Un esempio di tale dispositivo è la pompa endovenosa Deltec CADD-PLUS™ modello 5400.

Le composizioni farmaceutiche possono essere sotto forma di una sospensione acquosa od oleosa iniettabile sterile per somministrazione intramuscolare e sottocutanea. Questa sospensione può essere formulata secondo l'arte nota usando quegli agenti disperdenti o bagnanti e agenti sospensivanti idonei che sono stati menzionati sopra. La preparazione iniettabile sterile può anche essere una soluzione o sospensione iniettabile sterile in un diluente o solvente accettabile per via parenterale atossico, per esempio come soluzione in 1,3-butandiolo. In addizione, oli fissi sterili sono convenzionalmente impiegati come solvente o mezzo sospensivante. A questo scopo può essere impiegato qualsiasi olio fisso blando inclusi mono- o digliceridi sintetici. In addizione, acidi grassi come acido oleico trovano uso nella preparazione di iniettabili.

Niraparib o un sale può anche essere somministrato sotto forma di supposte per somministrazione rettale del farmaco. Queste composizioni possono essere preparate miscelando il farmaco con un eccipiente non irritante idoneo che è solido a temperature ordinarie ma liquido alla temperatura rettale e che pertanto fonde nel retto per rilasciare il farmaco. Tali materiali includono burro di cacao, gelatina glicerinata, oli vegetali idrogenati, miscele di polietilenglicoli di vari pesi molecolari ed esteri di acidi grassi di polietilenglicole.

Per uso topico sono impiegate creme, unguenti, gelatine, soluzioni o sospensioni, ecc., contenenti i composti in questione. (Per gli scopi di questa domanda di brevetto, un'applicazione topica include collutori e gargarismi.)

Niraparib o un sale può essere somministrato in forma intranasale tramite uso topico di idonei veicoli intranasali e dispositivi di erogazione, o tramite vie transdermiche, usando quelle forme di cerotti transdermici per la pelle ben note agli esperti dell'arte. Per essere somministrata sotto forma di sistema di

erogazione transdermica, la somministrazione di dosaggio è, ovviamente, continua anziché intermittente per tutto il regime di dosaggio. Niraparib o un sale può anche essere erogato come supposta impiegando basi come burro di cacao, gelatina glicerinata, oli vegetali idrogenati, miscele di polietilenglicoli di vari pesi molecolari ed esteri di acidi grassi di polietilenglicole.

Quando niraparib o un sale è somministrato a un soggetto, il livello di dosaggio selezionato dipende da una varietà di fattori inclusi, ma non limitati a, l'attività del particolare composto, la gravità dei sintomi dell'individuo, la via di somministrazione, il tempo di somministrazione, il tasso di escrezione del composto, la durata del trattamento, altri farmaci, composti, e/o materiali usati in combinazione, e l'età, sesso, peso, condizione, salute generale, e storia medica antecedente del paziente. La quantità di niraparib e la via di somministrazione sono in ultima analisi a discrezione del medico, sebbene generalmente il dosaggio è per conseguire concentrazioni locali in corrispondenza del sito di azione che conseguano l'effetto desiderato senza causare effetti collaterali dannosi o deleteri sostanziali.

Una somministrazione in vivo può essere attuata in un'unica dose, in modo continuo o intermittente (ad es. in dosi suddivise a intervalli appropriati) per tutto il corso di trattamento. Metodi di determinazione dei mezzi e del dosaggio di somministrazione più efficaci sono ben noti agli esperti dell'arte e variano con la formulazione usata per terapia, lo scopo della terapia, la cellula bersaglio che viene trattata, e il soggetto che viene trattato. Possono essere compiute somministrazioni singole o multiple, con il livello e il motivo della dose che vengono selezionati dal medico curante.

In generale, una dose idonea di niraparib è nell'intervallo da circa 100 µg a circa 250 mg per chilogrammo di peso corporeo del soggetto al giorno. Quando il

composto attivo è un sale, un estere, profarmaco, o simili, la quantità somministrata è calcolata sulla base del composto progenitore e così il peso effettivo da usare viene aumentato proporzionalmente.

Una quantità terapeuticamente efficace di niraparib o una composizione farmaceutica di esso per il trattamento di cancro della prostata come definito nelle rivendicazioni include un intervallo di dose da circa 30 mg/giorno a circa 400 mg/giorno di niraparib, o qualsiasi quantità o intervallo particolare in esso, in particolare circa 300 mg/giorno, e una somministrazione orale una volta al giorno in tre forme di dosaggio orale da 100 mg. Dosaggi ottimali di niraparib da somministrare possono essere prontamente determinati e variano con il particolare composto usato, la modalità di somministrazione, la forza della preparazione e l'avanzamento della malattia, sindrome, condizione o disturbo. In addizione, fattori associati al particolare soggetto che viene trattato, inclusi sesso, età, peso, regime alimentare e tempo di somministrazione del soggetto, danno come risultato la necessità di regolare la dose per conseguire un livello terapeutico appropriato e l'effetto terapeutico desiderato. I dosaggi di cui sopra sono dunque esemplificativi del caso medio. Vi possono essere, naturalmente, istanze individuali in cui sono da tenere presente intervalli di dosaggio più alti o più bassi, e tali rientrano nell'ambito di questa invenzione.

Niraparib può essere somministrato come definito nelle rivendicazioni in qualsiasi delle precedenti composizioni e regimi di dosaggio o per mezzo di quelle composizioni e regimi di dosaggio stabiliti nell'arte ogniqualvolta l'uso di niraparib è richiesto per un soggetto che ne necessita.

Esempi

Gli Esempi seguenti sono esposti per agevolare la comprensione dell'invenzione, e non sono intesi e non devono essere interpretati limitare in alcun

modo l'invenzione esposta nelle rivendicazioni che seguono successivamente.

Esempio 1

Citotossicità in vitro di niraparib in linee di tumore della prostata umano

La citotossicità di niraparib è stata sottoposta a prova in vitro in svariate linee di tumore della prostata umano. Nessuna delle linee di tumore è nota per essere carente di BRCA-1 o BRCA-2.

Metodi:

la citotossicità in vitro di niraparib è stata accertata in 5 linee di cellule di cancro della prostata umano: C4-2B, LNCaP, LNCaP AR.TB, VCaP, e 22Rv1. Le linee di cellule C4-2B, LNCaP, LNCaP AR.TB, e 22Rv1 sono state fatte crescere in mezzo RPMI1640+GlutaMAX™-I (Life Technologies n. 61870-036) integrato con siero fetale bovino (FBS, Fetal Bovine Serum) inattivato con calore al 10% (Life Technologies n. 16140-071) e amminoacidi non essenziali (NEAA) (Life Technologies n. 11140-050); e cellule VCaP sono state fatte crescere in mezzo DMEM+GlutaMAX™-I (Life Technologies n. 10569-010) con FBS al 10% e NEAA. Le cellule VCaP sono state sottoposte a sottocoltura ogni 7 giorni; altre linee sono state separate ogni 3-4 giorni.

La cinetica di crescita delle cellule di ciascuna linea di cellule è stata determinata seminando cellule a svariate densità e monitorando la crescita a intervalli fino a 7 giorni. La crescita è stata determinata usando il reagente Promega Cell TiterGlo (n. G7571) per misurare l'ATP cellulare per mezzo di una reazione chemiluminescente luciferina-luciferasi. Le piastre sono state lette su un lettore di piastre Perkin-Elmer Envision, e i valori di luminescenza sono stati tracciati in grafico al fine di identificare le densità di semina che hanno dato come risultato una crescita in fase logaritmica e una densità delle cellule all'interno dell'intervallo

lineare del saggio Cell TiterGlo in corrispondenza del punto nel tempo desiderato.

Per esperimenti di citotossicità di niraparib, cellule sono state raccolte mediante breve tripsinizzazione e ciascuna linea è stata seminata nei 60 pozzetti interni di piastre da 96 pozzetti in 100 μ l di mezzo di coltura a una densità appropriata per un trattamento di 7 giorni. I pozzetti esterni di ciascuna piastra sono stati riempiti con soluzione salina tamponata con fosfato secondo Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Life Technologies n. 14190-144) per ridurre l'evaporazione dai pozzetti di prova. Le cellule sono state lasciate riposare per tutta la notte nelle piastre a 37 °C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. Il trattamento è stato iniziato mediante addizione di 50 μ l di niraparib 3X (concentrazioni finali 500, 125, 31,3, 7,8, 1,95, 0,49, 0,12, 0,03 μ M) nel mezzo appropriato per pozzetti in triplicato. La concentrazione finale di veicolo era lo 0,5% di DMSO.

Le cellule sono state coltivate per 7 giorni. La vitalità relativa delle cellule dopo il trattamento è stata determinata usando il reagente Cell TiterGlo, come sopra. Tutti i valori di emissione luminescente sono stati normalizzati sulla percentuale di inibizione basata sulla luminescenza media dei pozzetti di controllo non trattati, e l'inibizione percentuale media dei pozzetti di controllo con veicolo è stata sottratta da ciascun valore di trattamento. L'inibizione percentuale è stata tracciata in grafico contro il log della concentrazione in μ M in GraphPad Prism 7.00. Una regressione non lineare e calcolo dei valori di EC₅₀ sono stati svolti usando il log(agonista) contro risposta - adattamento a pendenza variabile (quattro parametri).

Risultati:

i risultati del saggio di citotossicità sono mostrati nella Figura 1 e nella Tabella 1. La crescita di ciascuna linea di cellule è stata ridotta in una foggia dose-dipendente aumentando le concentrazioni di niraparib. Le cellule C4-2B sono sembrate essere

quelle massimamente più sensibili, con un valore di EC₅₀ di ~1,2 µM. Le cellule VCaP sono sembrate essere quelle minimamente sensibili con un valore di EC₅₀ di 4,1 µM.

Tabella 1. Valori di EC₅₀ per trattamento con niraparib di 7 giorni su linee di cellule di tumore della prostata umano.

Linea di cellule	EC₅₀, µM
C4-2B	1,222
LNCaP	3,502
LNCaP AR.TB	2,140
VCaP	4,099
22Rv1	3,517

Esempio 2

Inibizione di formazione di PAR mediante niraparib

L'abilità di niraparib di inibire la formazione di poli(ADP)ribosio (PAR) è stata sottoposta a prova in due linee di tumore della prostata umano in vitro. Né l'una né l'altra delle linee di tumore è nota per essere carente di BRCA-1 o BRCA-2.

Metodi:

l'inibizione di PAR usando niraparib è stata accertata in 2 linee di cellule di cancro della prostata umano, C4-2B e VCaP. La linea di cellule C4-2B è stata fatta crescere in mezzo RPMI1640+GlutaMAX™-I integrato con FBS al 10% e NEAA e separata ogni 3-4 giorni. Cellule VCaP sono state fatte crescere in mezzo DMEM+GlutaMAX™-I con FBS e NEAA e sottoposte a sottocoltura ogni 7 giorni.

Le cellule sono state raccolte mediante breve tripsinizzazione e ciascuna linea è stata seminata in piastre da 6 pozzetti in 1 ml di mezzo a una densità

appropriata. Sono stati addizionati 500 μ l extra di mezzo completo, per un volume totale per pozzetto di 1,5 ml. Le cellule sono state lasciate riposare per tutta la notte nelle piastre a 37 °C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. Il giorno dopo, il mezzo è stato rimosso dalle piastre e le cellule sono state lavate usando 1 ml di mezzo privo di siero (rispettivamente RPMI o DMEM). Il trattamento è stato iniziato mediante addizione 1 ml di niraparib (concentrazioni finali 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0 μ M in DMSO allo 0,1%) nel mezzo appropriato per pozzetti in triplicato. Le piastre sono state riportate nell'incubatore per due ore.

In seguito al trattamento, gli estratti sono stati preparati usando reagenti e procedure forniti nel saggio farmacodinamico in vivo HT PARP II (Trevigen n. 4520-096-K). Il mezzo è stato rimosso da ciascun pozzetto e posto in provette per microcentrifuga etichettate separate, e le piastre sono state poste su ghiaccio. Le provette sono state centrifugate a 1500 giri/min per 4 minuti per pellettizzare eventuali cellule che si erano staccate dalla piastra durante l'incubazione del farmaco. Un tampone di lisi è stato preparato usando 24,5 ml di reagente di lisi di cellule con 250 μ l di PMSF 100 mM (in etanolo; Sigma n. 93482) e 250 μ l di cocktail di inibitori di proteasi 100X (Thermo Scientific n. 78429). Tampone di lisi (300 μ l) è stato addizionato a ciascun pozzetto delle piastre, su ghiaccio. Le cellule aderenti sono state raschiate nel tampone di lisi e tenute su ghiaccio per almeno 15 minuti. Il surnatante è stato rimosso dalle provette per microcentrifuga, e i lisati di cellule dalle piastre a 6 pozzetti sono stati addizionati a ciascuna provetta dalle provette corrispondenti. SDS (20% p/v) è stato addizionato per portare la concentrazione finale di SDS all'1%. Gli estratti di cellule sono stati riscaldati a 95-100 °C per 5 minuti. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, 0,01 volumi di catione magnesio 100X e 3 μ l di DNasi sono stati addizionati a ciascuna provetta. Le

provette sono state brevemente agitate con vortice e riportate in un incubatore a 37 °C per 90 minuti. Dopo l'incubazione, le provette sono state centrifugate a 10.000 × g per 10 minuti a temperatura ambiente. Se era presente un pellet, questo è stato rimosso usando una punta di pipetta e gli estratti sono stati trasferiti a una piastra di diluizione a 96 pozzetti. Gli estratti di cellule sono stati congelati a -80 °C fino al momento dell'uso per la quantificazione delle proteine e il saggio PAR ELISA. Il protocollo del saggio ELISA è stato svolto secondo le istruzioni del fabbricante.

La quantificazione delle proteine è stata svolta usando il kit di saggio di proteine Biorad DC II (n. 500-0002) compatibile con detergente con l'insieme standard di albumina sierica bovina Biorad Quick Start (n. 5000207) secondo il protocollo per piastre a 96 pozzetti del fabbricante. Un tampone di lisi ELISA è stato immesso come fortificazione negli standard, e un volume uguale di PBS è stato addizionato a tutti i pozzetti di campione per correggere un eventuale effetto del tampone di lisi sulle letture delle proteine. I campioni sono stati saggiati in duplicato. Il tampone A' (25 µl) è stato addizionato a tutti i pozzetti della piastra, e 200 µl di Tampone B sono stati addizionati immediatamente a ciascun pozzetto. Le piastre sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente su un vibratore. L'assorbanza è stata letta a 750 nm su un lettore di piastre Molecular Devices M5, usando il protocollo di saggio di proteine DC nel software SoftMax Pro versione 6.3. Una regressione lineare della curva standard, interpolazione dei valori di proteine del campione, e il calcolo della media delle repliche sono state svolte nel software. I dati sono stati esportati in Excel, dove sono state svolte eventuali correzioni per la diluizione del campione.

I valori di luminescenza per standard e campioni PAR ELISA sono stati analizzati in GraphPad Prism versione 7, dove sono state calcolate la regressione

lineare della curva standard e l'interpolazione dei valori del campione. I valori di PAR interpolati (pg di PAR/ml) sono stati corretti per la diluizione del campione e divisi per la concentrazione di proteine corrispondente per dare in resa pg di PAR/mg di proteina. Questi valori sono stati rappresentati graficamente in GraphPad Prism v7.

Risultati:

i risultati dal saggio PAR sono mostrati nella Figura 2. PAR è stato ridotto in una foggia dose-dipendente aumentando le concentrazioni di niraparib in ciascuna linea di cellule.

Esempio 3

Niraparib induce γ -H2AX in linee di tumore della prostata umano in vitro

L'abilità di niraparib di indurre rotture del doppio filamento nel DNA è stata misurata in 3 linee di cellule di cancro della prostata umano: 22RV1, LNCaP AR.TB, e C4-2B. Le rotture del doppio filamento nel DNA sono seguite da fosforilazione dell'istone adiacente γ -H2AX, e questa fosforilazione può essere misurata mediante colorazione di anticorpi e citometria a flusso.

Metodi:

le linee di cellule 22RV1, LNCaP AR.TB, e C4-2B sono state fatte crescere come delineato sopra. Le linee di cellule sono state sottoposte a passaggi ogni 3-4 giorni.

Per ciascuna linea di cellule, 2×10^5 cellule sono state seminate in ogni pozzetto di una piastra da 12 pozzetti (Falcon n. 353043) in un volume di 1 ml di mezzi. Le cellule sono state lasciate riposare per tutta la notte in un incubatore a 37 °C umidificato con CO₂ al 5%, quindi 1 ml di mezzi contenenti niraparib diluito in serie concentrato 2X è stato addizionato per conseguire concentrazioni finali di 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,57, 0,78, 0,39, 0,2 e 0,1 μ M in pozzetti in

triplicato. La concentrazione finale di veicolo era lo 0,2% di DMSO e pozzetti in triplicato di controlli di veicolo e mezzi sono stati anche ottenuti per ciascuna linea di cellule. Le piastre sono state incubate per altre 18 ore.

In seguito all'incubazione di 18 ore con farmaco, ciascun pozzetto di cellule è stato raccolto dapprima trasferendo i 2 ml di mezzi in una provetta conica da 15 ml (Corning n. 430798). 500 µl di tampone di dissociazione di cellule (Gibco n. 13151-014) sono stati quindi addizionati al pozzetto e lasciati stare per 5 minuti. Usando una pipetta da 1 ml, 1 ml di mezzi è stato addizionato al pozzetto, le cellule sono state dislocate mediante pipettaggio, e i mezzi contenenti cellule sono stati trasferiti nella corrispondente provetta conica da 15 ml. Le provette sono state centrifugate a 1200 giri/min per 5 minuti, il surnatante è stato scartato, e le cellule pellettate sono state risospese e trasferite a una piastra con fondo a V da 96 pozzetti (Costar n. 3896). Le piastre sono state centrifugate a 1800 giri/min per 3 minuti, il surnatante scartato, quindi i pozzetti sono stati lavati con 200 µl di DPBS. Questo processo è stato ripetuto per un totale di 3 lavaggi. Le cellule sono state quindi colorate con 100 µl di DPBS contenente una diluizione 1:800 di acqua fissabile vive/morte Invitrogen (Invitrogen n. L34957) per 20 minuti a 4 °C. Le cellule sono state quindi lavate con 150 µl di tampone di colorazione BD Pharmingen (tampone di colorazione; BD n. 554657) e centrifugate a 1800 giri/min per 3 minuti. Le cellule sono state lavate nuovamente 2 volte con 200 µl di tampone di colorazione e quindi una volta con DPBS.

Le cellule sono state fissate con 100 µl di etanolo al 70% a -20 °C/H₂O e le piastre sono state stoccate a -20 °C per 2 ore. Le cellule sono state lavate 3 volte con tampone di colorazione centrifugando a 2200 giri/min per 3 minuti tra ciascun lavaggio. Le cellule sono state quindi incubate con 100 µl di un tampone di colorazione con diluizione 1:1 e bloccante di recettore di Fc privo di biotina

AXELL (Accurate Chemical & Scientific Corp n. NB309) per 20 minuti a 4 °C. Le cellule sono state lavate con 150 µl di tampone di colorazione, quindi centrifugate a 2200 giri/min per 3 minuti, il surnatante scartato, quindi le cellule sono state incubate con 50 µl di tampone di colorazione contenente 0,2% v/v di Triton X-100 (Acros Organics n. 21568-2500) per 2 ore a temperatura ambiente al buio unitamente a diluizioni 1:100 di anticorpo γ -H2AX (Biolegend n. 613408).

Le cellule sono state lavate una volta con 200 µl di tampone di colorazione contenente lo 0,2% v/v di Triton X-100, e quindi lavate una volta soltanto con 200 µl di tampone di colorazione. Le cellule sono state risospese in 80 µl di tampone di colorazione e 50 µl sono stati analizzati su un citometro a flusso BD Fortessa. I dati sono stati analizzati usando TreeStar FlowJo v9.8.5. I dati sono stati sottoposti a gating su cellule vive, quindi, quindi in seguito a discriminazione delle doppiette, l'intera popolazione è stata accertata per il segnale dell'anticorpo γ -H2AX. I risultati sono stati rappresentati graficamente in GraphPad Prism v7.

Risultati:

Istogrammi rappresentativi per la linea di cellule 22RV1 sono mostrati nella Figura 3, che raffigurano l'effetto di differenti concentrazioni di niraparib. Campioni trattati con farmaco sono stati confrontati con controlli di veicolo e di mezzi e sono rappresentati graficamente nella Figura 4. Le concentrazioni più basse in assoluto dove il segnale γ -H2AX si innalza significativamente al di sopra del controllo di veicolo sono indicate nella Tabella 2. I risultati mostrano che, in ciascuna linea di tumore della prostata, niraparib induce γ -H2AX in una maniera dose-dipendente.

Tabella 2. Concentrazione minima di niraparib che induce un cambiamento significativo in γ -H2AX

Linea di cellule	1 ^a concentrazione significativa (μ M)
22RV1	1,57
LnCaP.AR.TB	3,13
C4-2B	1,57

Esempio 4

Niraparib inibisce la crescita di tumori della prostata umani C4-2B in topi

L'attività di niraparib è stata sottoposta a prova nel modello prestabilito di C4-2B sottocutaneo della prostata umano in topi gamma (NOD.Cg-Prkdc Il2rg/SzJ) (NSG) con immunodeficienza combinata grave (SCID) diabetici non obesi (NOD). Non si crede che questo modello di tumore sia carente di BRCA-1 o BRCA-2.

Metodi:

il veicolo era metilcellulosa allo 0,5% (Methocel™ F4M) preparata e tenuta a 4 °C al buio. Tutte le formulazioni sono state realizzate per essere dosate a un volume di 10 ml/kg di peso corporeo. Sono stati usati topi NSG maschi (Jackson Laboratories). Gli animali sono stati fatti acclimatare per una settimana antecedentemente allo svolgimento di qualsiasi procedura sperimentale. I topi sono stati ospitati in gruppi (5 per gabbia) in gabbie IVC monouso (Innovive, San Diego, CA, Stati Uniti) in un ciclo di luce:buio di 12 h a una temperatura da 19 a 22 °C e umidità dal 35 al 40%. I topi sono stati alimentati con regime alimentare di laboratorio ad alto tenore di grassi (6%) autoclavato, e acqua ad libitum.

Ai topi sono state iniettate cellule LNCaP marcate con tag di C4-2B-luc (1×10^6 cellule di tumore in un volume di 200 μ l di mezzo Cultrex®:RPMI 1640 (rapporto 1:1) sul fianco destro. I topi sono stati randomizzati secondo i volumi del tumore

(volume di tumore = $241 \pm 14 \text{ mm}^3$), con 10 topi per gruppo di trattamento. Ai topi sono stati somministrati quotidianamente mediante sondino (p.o.) veicolo, o veicolo contenente niraparib come indicato nel seguito a un volume di dosaggio di 10 ml/kg. Inizio del trattamento = Giorno 1. I topi sono stati trattati fino al giorno 24 dello studio.

- Gruppo 1 0 mg/kg di veicolo (Methocel F4M allo 0,5%) somministrato q.d. p.o.
- Gruppo 2 25 mg/kg di niraparib in Methocel F4M allo 0,5% somministrato q.d. p.o.
- Gruppo 3 50 mg/kg di niraparib in Methocel F4M allo 0,5% somministrato q.d. p.o.

Per ciascun animale individuale, peso corporeo e volume di tumore [usando la formula: Volume di tumore (mm^3) = $(a \times b^2/2)$; dove 'a' rappresenta la lunghezza, e 'b' la larghezza del tumore come determinato mediante misurazioni con calibro], sono stati monitorati due volte alla settimana per tutto lo studio. Per i tumori prestabiliti, un decorso nel tempo della crescita del tumore è espresso come media \pm errore standard della media (SEM).

Risultati:

i topi trattati con veicolo hanno iniziato a raggiungere i limiti etici per il volume del tumore intorno al giorno 22 dello studio in poi (si veda la Figura 5 per i volumi di tumore individuali). I dati del volume di tumore sono stati presentati fino al giorno 24 dello studio (quando 9 dei 10 topi trattati con veicolo sono rimasti nello studio). Dopo 18, 22, e 24 giorni di trattamento, il gruppo 3 a cui era stato somministrato quotidianamente niraparib 50 mg/kg p.o. ha mostrato una inibizione/ritardo significativi nella crescita del tumore, con valori di inibizione della crescita del tumore (TGI, Tumor Growth Inhibition) di ~40% in questi giorni. Differenze significative nella crescita del tumore sono state osservate nei giorni 18, 22 e 24 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). I topi cui sono stati somministrati 25 mg/kg di niraparib non hanno mostrato una significativa inibizione della crescita del tumore, anche se vi è stata una modesta TGI di ~12% nei giorni 22 e 24.

Esempio 5

Uno studio in aperto multicentrico è compiuto per accertare l'efficacia e sicurezza di un dosaggio una volta al giorno di 300 mg di niraparib in soggetti maschi di età di oltre 18 anni con mCRPC e anomalie della riparazione del DNA che avevano ricevuto almeno una linea di chemioterapia a base di taxani e almeno una linea di terapia antiandrogeni (ad es. abiraterone acetato, enzalutammide, apalutammide). Lo studio arruola approssimativamente 100 soggetti. I soggetti sono monitorati per la sicurezza durante il periodo dello studio, e fino a 30 giorni dopo l'ultima dose del farmaco di studio. Il trattamento continua fino alla progressione della malattia, tossicità inaccettabile, decesso, o interruzione dello studio da parte dello sponsor.

Lo studio consiste in 4 fasi; una Fase di pre-screening soltanto per valutazione di biomarcatori, una Fase di screening, una Fase di trattamento, e una Fase di follow-up. Le valutazioni di efficacia includono quanto segue: misurazioni del tumore: scansioni TC o RM di torace, addome, e bacino e scansioni ossee dell'intero corpo (^{99m}Tc), PSA sierico, stato di sopravvivenza, CTC, ed evento scheletrico sintomatico (SSE, Symptomatic Skeletal Event).

Niraparib, 300 mg, è fornito come capsule (3×100 mg) per somministrazione orale una volta al giorno. Le capsule devono essere deglutite intere. I soggetti devono assumere la dose al mattino (con o senza cibo). Sebbene non sia considerato medicinale di studio, i soggetti che non hanno subito una castrazione chirurgica devono continuare a ricevere GnRHa regolarmente prescritto. Tutte le terapie con GnRHa devono essere registrate nella sezione dei medicinali concomitanti della scheda di documentazione elettronica eCRF.

Un ciclo di trattamento è definito come 28 giorni. I soggetti iniziano ad assumere niraparib il Giorno 1 del Ciclo 1. Quantitativi sufficienti di niraparib per

ciascun ciclo di trattamento sono distribuiti il primo giorno di ciascun ciclo. Se il soggetto salta una dose, allora quella dose deve essere rimpiazzata se il soggetto se ne ricorda entro una finestra approssimativa di 12 ore. Altrimenti, i soggetti devono assumere la dose dopo il giorno seguente, senza compensare la dose saltata. Le dosi saltate devono essere registrate nell'eCRF.

Fase di pre-screening per valutazione di biomarcatori

La Fase di pre-screening valuta se un potenziale soggetto è positivo a biomarcatore per anomalie di riparazione del DNA. A tutti i soggetti è richiesto di firmare uno specifico ICF per la Fase di pre-screening e di fornire le caratteristiche demografiche al basale e l'anamnesi medica specifica della malattia. La Fase di pre-screening può avvenire in qualsiasi momento antecedentemente alla Fase di screening.

Il processo per determinare la positività a biomarcatore è differente per i soggetti che entrano nella Fase di pre-screening prima che sia disponibile un saggio basato sul sangue, in confronto a quei soggetti che entrano dopo che è disponibile un saggio basato sul sangue. I 2 processi sono descritti nel seguito.

Processo per determinare la positività a biomarcatore prima che un saggio basato sul sangue sia disponibile

Il soggetto firma l'ICF di pre-screening. Se il tessuto di tumore del soggetto è stato precedentemente analizzato mediante la batteria per geni FoundationOne®, allora, dopo che il soggetto ha concesso una liberatoria, i dati di FoundationOne® possono essere riesaminati per determinare l'eleggibilità in base ai criteri definiti nella Tabella 1. Se il soggetto è positivo a biomarcatore, è eleggibile per entrare nella Fase di screening. Se il tessuto di tumore del soggetto non è stato precedentemente analizzato mediante la batteria per geni FoundationOne®, allora tessuto di tumore di

archivio o raccolto di recente (consigliato) deve essere analizzato per la positività a biomarcatore mediante una prova approvata dallo sponsor. Se il soggetto è positivo a biomarcatore, è eleggibile per entrare nella Fase di screening.

Durante la Fase di pre-screening sono anche raccolti campioni di sangue da tutti i soggetti, e sono stoccati per quando diventa disponibile un saggio basato sul sangue. Nel momento in cui è disponibile un saggio basato sul sangue, il campione di sangue stoccato viene analizzato per la concordanza con i risultati del campione di tessuto di tumore. Questa analisi può verificarsi in qualsiasi momento dopo che il saggio basato sul sangue diventa disponibile.

Processo per determinare la positività a biomarcatore dopo che un saggio basato sul sangue è disponibile

Il soggetto firma l'ICF di pre-screening. Il sangue del soggetto è prelevato e inviato per l'analisi di positività a biomarcatore. Se il tessuto di tumore del soggetto è stato precedentemente analizzato mediante la batteria per geni FoundationOne®, allora, dopo che il soggetto ha concesso una liberatoria, i dati di FoundationOne® possono essere riesaminati per determinare l'eleggibilità in base ai criteri definiti nella Tabella 1. Se il soggetto è positivo a biomarcatore, è eleggibile per entrare nella Fase di screening e non necessita di attendere i risultati dell'analisi basata sul sangue. Se la batteria per geni FoundationOne® è negativa, il soggetto può comunque essere considerato eleggibile se si determina che è positivo a biomarcatore mediante il saggio basato sul sangue. Se il tessuto di tumore del soggetto non è stato precedentemente analizzato mediante la batteria per geni FoundationOne® ed è disponibile tessuto di archivio, allora viene iniziata una richiesta di recupero e analisi del tessuto di tumore archiviato. Se i risultati del saggio basato sul sangue sono positivi a biomarcatore, allora il soggetto è eleggibile

per entrare nella Fase di screening e non necessita di attendere i risultati dell'analisi basata su tessuto di tumore di archivio. I risultati dall'analisi basata su tessuto di tumore di archivio, quando sono disponibili, possono essere usati congiuntamente ai risultati basati sul sangue per studi di concordanza e ponte.

A discrezione dello sponsor dello studio, se i risultati del saggio basato sul sangue sono negativi, per determinare l'eleggibilità possono quindi essere usati i risultati basati su tessuto di tumore di archivio.

Se non è disponibile alcun tessuto di tumore di archivio, allora il soggetto deve acconsentire alla raccolta del tessuto di tumore.

Se i risultati del saggio basato sul sangue sono positivi a biomarcatore, allora il tessuto di tumore recente deve essere raccolto antecedentemente al Giorno 1 del Ciclo 1 per un uso più avanti negli studi di concordanza e ponte. Un'analisi del tessuto di tumore recentemente raccolto può verificarsi in qualsiasi momento durante lo studio e i risultati possono non essere richiesti antecedentemente all'entrata del soggetto nella Fase di screening.

A discrezione dello sponsor dello studio, se i risultati del saggio basato sul sangue sono negativi, allora il tessuto di tumore recentemente raccolto può essere usato per determinare l'eleggibilità.

Una volta che i soggetti sono identificati come positivi a biomarcatore durante la Fase di pre-screening, la Fase di screening inizia entro 30 giorni.

Fase di screening

Tutti i soggetti positivi a biomarcatore devono firmare l'ICF di studio principale antecedentemente alla conduzione di qualsiasi procedura correlata allo studio nella Fase di screening. Durante questa fase, i criteri di eleggibilità vengono riesaminati e viene svolta una valutazione clinica completa come specificato nel

Programma orari ed eventi. Le procedure di screening sono svolte fino a 35 giorni prima del Giorno 1 del Ciclo 1, salvo altrimenti specificato. L'imaging viene accettato fino a 8 settimane antecedentemente al Giorno 1 del Ciclo 1. Valutazioni di screening di laboratorio sulla sicurezza clinica possono essere usate per gli accertamenti del Giorno 1 del Ciclo 1 se svolte entro 14 giorni del Ciclo 1.

I soggetti che non soddisfano tutti i criteri di inclusione, o che soddisfano un criterio di esclusione, possono essere sottoposti a un nuovo screening una volta. Il sottoponimento a nuovo screening è a discrezione dell'investigatore e richiede l'approvazione e l'accordo dello sponsor. I soggetti che devono essere sottoposti a nuovo screening devono firmare un nuovo ICF prima di essere sottoposti al nuovo screening. I soggetti sottoposti a nuovo screening entro 35 giorni dall'arruolamento pianificato possono usare i risultati iniziali di screening di laboratorio, tomografia computerizzata (CT, Computed Tomography)/imaging a risonanza magnetica (MRI, Magnetic Resonance Imaging) e scansioni ossee (se ancora entro 8 settimane dal Giorno 1 del Ciclo 1) per determinare l'eleggibilità se non il motivo del nuovo screening.

Fase di trattamento

La Fase di trattamento comincia il Giorno 1 del Ciclo 1 e continua fino a quando il farmaco di studio viene interrotto. Le ultime misurazioni prese il Giorno 1 del Ciclo 1 prima della somministrazione del farmaco di studio o allo screening (a seconda di quale valore sia stato l'ultimo) sono definite valori basali. Le visite per ogni ciclo hanno una finestra temporale di ± 3 giorni, salvo altrimenti specificato. Le visite di studio sono calcolate dalla data del Giorno 1 del Ciclo 1. I soggetti possono essere sottoposti a imaging entro ± 7 giorni dalle visite che richiedono immagini. Si faccia riferimento al Programma orari ed eventi per le

visite di trattamento e gli accertamenti durante la Fase di trattamento.

Nei giorni di campionamento di farmacocinetica e farmacodinamica, il soggetto non deve assumere il farmaco di studio a casa la mattina delle visite di studio. Il farmaco di studio deve essere assunto presso il sito. I dettagli sui giorni e gli orari dei campionamenti di farmacocinetica e farmacodinamica sono forniti nel Programma orari ed eventi. Dettagli addizionali riguardanti il campionamento di farmacocinetica sono forniti nella Sezione 9.3. I dettagli sulle procedure di manipolazione e stoccaggio dei campioni di sangue per farmacocinetica e farmacodinamica sono forniti nel manuale di laboratorio.

Le valutazioni cliniche e gli studi di laboratorio possono essere ripetuti più frequentemente, se clinicamente indicato. Il trattamento con il farmaco di studio continua fino a progressione della malattia, tossicità inaccettabile, decesso, o interruzione dello studio da parte dello sponsor. Una volta che il soggetto interrompe il farmaco di studio, il soggetto deve completare la visita di fine trattamento (EoT, End-of-Treatment) entro 30 giorni dopo l'ultima dose di farmaco di studio, ed entrare nella Fase di follow-up.

Visita di fine trattamento

Una Visita di fine trattamento deve essere programmata entro 30 giorni dopo l'ultima dose di farmaco di studio o antecedentemente alla somministrazione di una nuova terapia anti-cancro alla prostata, a seconda di quale si verifichi per primo. Se un soggetto non è in grado di tornare presso il sito per la visita EoT, il soggetto deve essere contattato per raccogliere gli AE che si sono verificati entro 30 giorni dopo l'ultima dose di farmaco di studio.

Fase di follow-up

Una volta che un soggetto ha completato la Fase di trattamento, un

follow-up sulla sopravvivenza ed SSE sono svolti ogni 3 mesi tramite visite cliniche, intervista telefonica, riesame della cartella, o altri metodi opportuni. I decessi, a prescindere dalla causalità, e gli SAE che si pensa siano correlati ai farmaci di studio sono raccolti e segnalati entro 24 ore dalla scoperta o dalla notifica dell'evento. Se le informazioni di follow-up sono ottenute tramite contatto telefonico, allora la documentazione scritta della comunicazione deve essere disponibile per riesame nei documenti fonte.

Campione positivo a biomarcatore per anomalie di riparazione del DNA

Per valutare se i soggetti sono positivi a biomarcatore, durante lo studio può essere disponibile un saggio basato sul sangue che fornisce un metodo più rapido rispetto all'analisi basata su tessuto per determinare lo stato di positivo a biomarcatore, al contempo essendo più opportuno per i soggetti. Antecedentemente alla disponibilità del saggio basato sul sangue, il tessuto di tumore (sia esso d'archivio o raccolto di recente) richiede un'analisi. Per garantire che tutti i soggetti, a prescindere da quando entrano nello studio, abbiano a disposizione gli stessi dati di biomarcatore per l'analisi (cioè per studi di concordanza e ponte), campioni di tessuto di tumore e di sangue sono raccolti da tutti i soggetti che firmano il modulo di consenso informato (ICF, Informed Consent Form) pre-screening. Il processo per determinare la positività a biomarcatore è differente per soggetti che entrano nella Fase di pre-screening prima che il saggio basato sul sangue sia disponibile, in confronto a quei soggetti che entrano dopo che il saggio basato sul sangue è disponibile. Tuttavia, lo stato di positività a biomarcatore sia nel tessuto di tumore che nel sangue viene accertato per tutti i soggetti.

Per essere eleggibili per lo studio, si deve confermare che i soggetti sono positivi a biomarcatore mediante tessuto di tumore (di archivio o raccolto di

recente), o mediante esecuzione di esami del sangue quando disponibili. I biomarcatori d'interesse per questo studio e i criteri di positività a biomarcatore sono elencati nella Tabella 3. Analisi sono svolte per definire un indicatore di perdita biallelica (ad es. frequenza di coespressione della mutazione con perdita di numero di copie) e questi indicatori possono essere usati per determinare la positività a biomarcatore non appena tali informazioni sono disponibili.

Tabella 3: batteria di biomarcatori e criteri per positività

Geni	Definizione	Lesione genomica richiesta per positività ^a
BRCA-1	Gene di cancro della mammella 1	- Delezione omozigote - Delezione eterozigote + mutazione deleteria - Perdita neutra di copia di eterozigosi + mutazione deleteria
BRCA-2	Gene di cancro della mammella 2	
FANCA	Gene A di gruppo di integrazione di anemia di Fanconi	
PALB2	Partner e localizzatore di gene BRCA2	
CHEK2	Gene 2 di chinasi di checkpoint	
BRIP1	Gene 1 di proteina elicasi C-terminale interagente con BRCA1	
HDAC2	Gene 2 di istone deacetilasi	

ATM	Gene mutato di atassia teleangectasia	
ATM	Gene mutato di atassia teleangectasia	Mutazione deleteria monoallelica nel dominio catalitico di chinasi
Geni di controllo		
AR	Gene del recettore degli androgeni	
TP53	Gene di proteina di tumore 53	

Una perdita monoallelica in tutti i geni è accettabile per l'entrata nello studio fino a quando non è convalidato l'algoritmo esistente per la perdita biallelica.

Cellule di tumore circolanti

Campioni di sangue sono raccolti in una provetta Cellsave in corrispondenza di punti nel tempo specificati nel Programma orari ed eventi. L'enumerazione delle CTC è valutata presso il laboratorio centrale, per accertare la risposta al farmaco di studio.

Sangue intero per RNA

Campioni di sangue intero sono raccolti in una provetta Paxgene. Molteplici trascritti di acido ribonucleico (RNA) trovati in tumori della prostata sono rilevabili nell'RNA e un'analisi di questi campioni consente una valutazione dei potenziali meccanismi di resistenza che possono emergere con niraparib.

DNA di tumore circolante

Campioni di plasma raccolti durante il corso del trattamento sono usati per sottoporre a screening cambiamenti nei livelli o tipi di anomalie di riparazione del DNA osservate nel tempo da DNA di tumore circolante (ctDNA), e per monitorare potenziali marcatori di resistenza a niraparib.

RIVENDICAZIONI

1. Niraparib o un sale di esso per l'uso in un metodo di trattamento di cancro della prostata in un essere umano che necessita di tale trattamento comprendente somministrare all'essere umano una quantità terapeuticamente efficace di niraparib, in cui l'essere umano è portatore di almeno un'anomalia di riparazione del DNA selezionata dal gruppo consistente in BRCA-1 e BRCA-2.
2. Niraparib o un sale di esso per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il cancro della prostata è resistente agli antiandrogeni.

3. Niraparib o un sale di esso per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui il cancro della prostata è cancro della prostata resistente a castrazione.
 4. Niraparib o un sale di esso per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui il cancro della prostata è cancro della prostata resistente a castrazione metastatico.
 5. Niraparib o un sale di esso per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui niraparib è somministrato in una quantità da circa 30 mg/giorno a circa 400 mg/giorno.
 6. Niraparib o un sale di esso per l'uso secondo la rivendicazione 5, in cui la quantità di niraparib somministrata è circa 300 mg/giorno.
 7. Niraparib o un sale di esso per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui niraparib è somministrato come somministrazione orale una volta al giorno in tre forme di dosaggio orale da 100 mg.
-

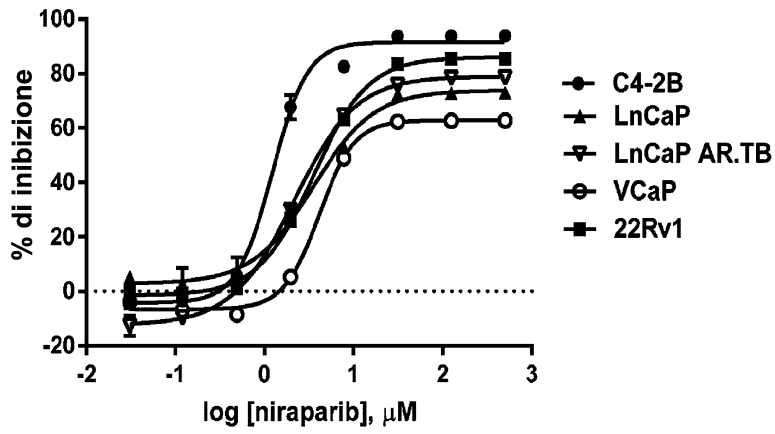


Figura 1. Niraparib inibisce la crescita di linee di cellule di tumore della prostata umano in vitro.

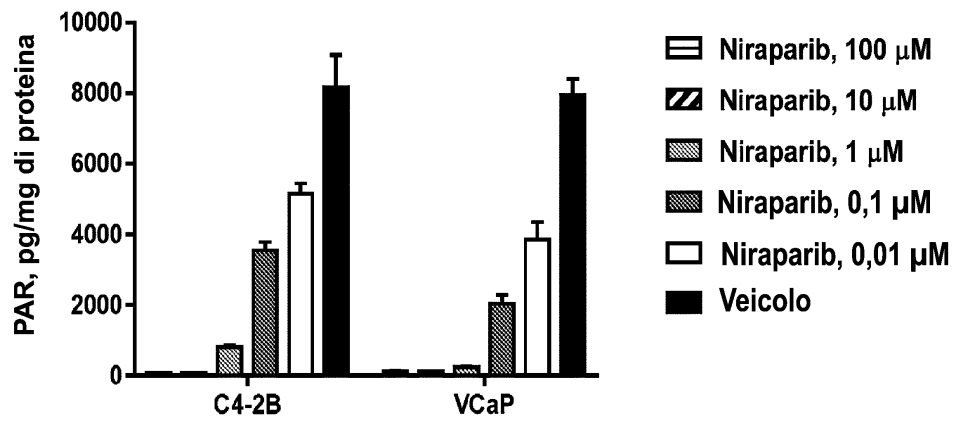


Figura 2. Niraparib sopprime la formazione di PAR in due linee di cellule di tumore della prostata umano in vitro.

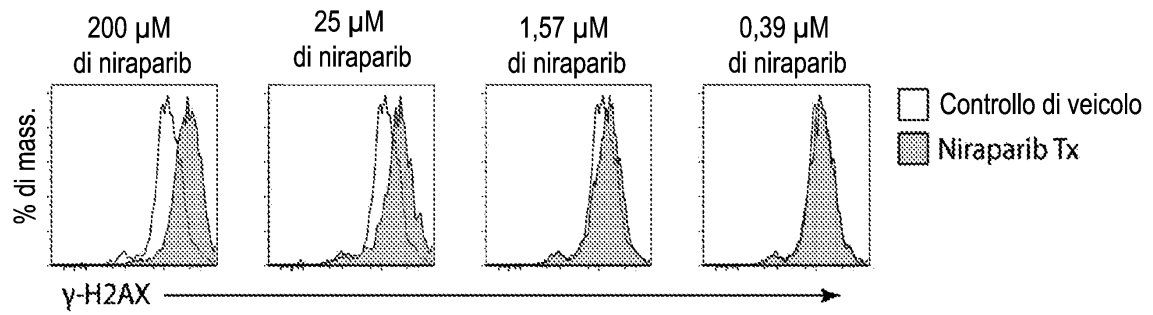


Figura 3. Un trattamento con niraparib induce γ -H2AX aumentato in cellule 22RV1 in una maniera dose-dipendente, come misurato mediante citometria a flusso.

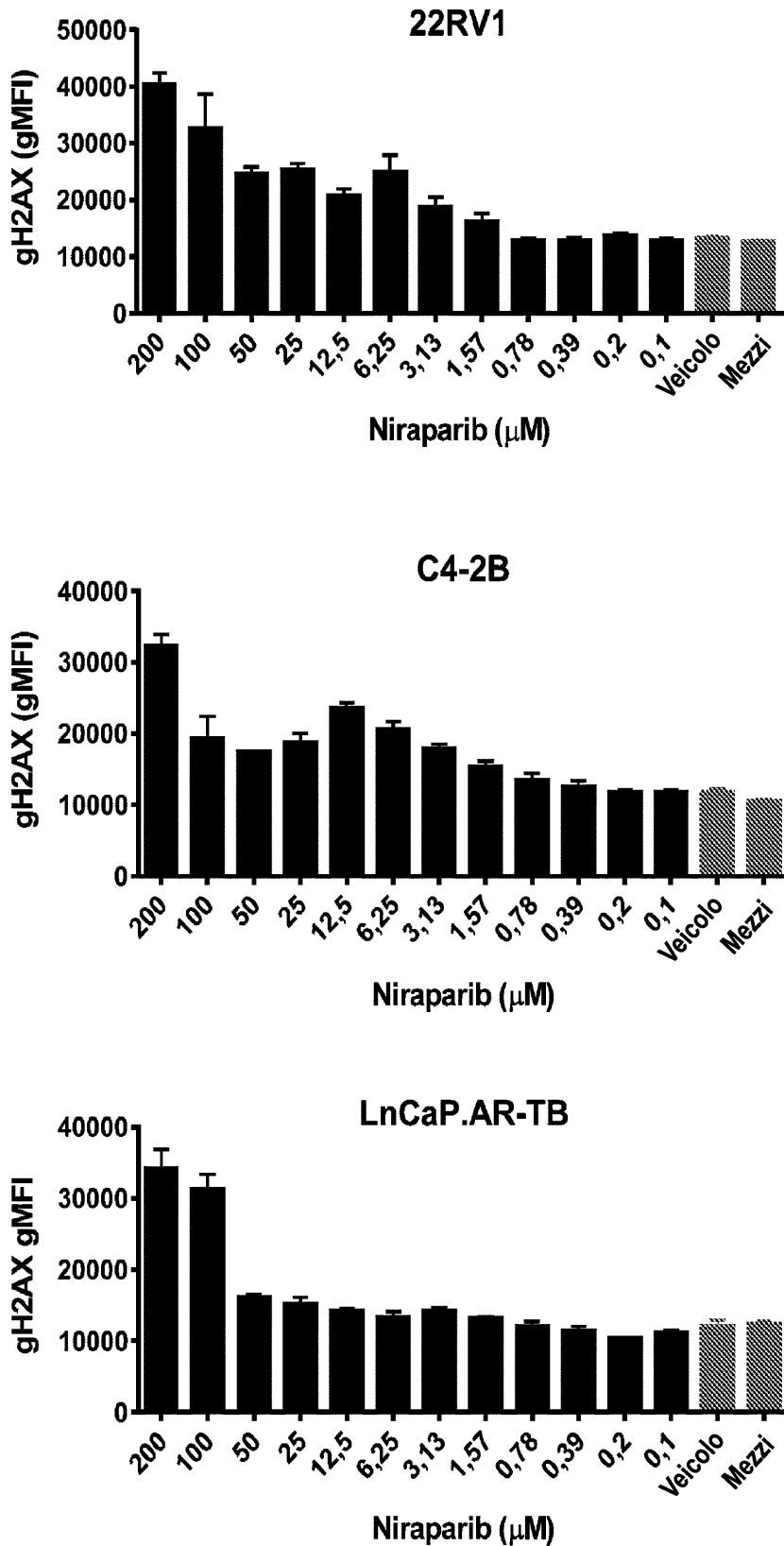


Figura 4. Niraparib induce γ -H2AX in cellule 22RV1, LNCaP AR-TB, e C4-2B in vitro.

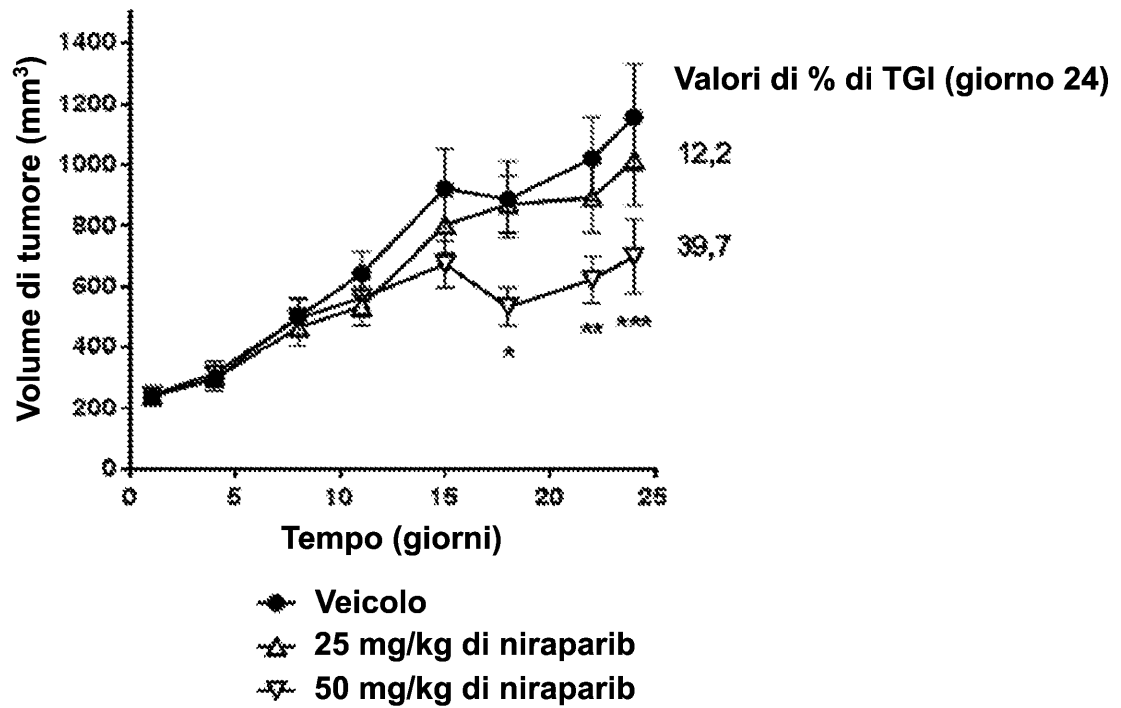


Figura 5. Un trattamento con niraparib inibisce la crescita di tumori della prostata C4-2B-luc in topi NSG maschi.