



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.12.30

(21) Номер заявки
201270730

(22) Дата подачи заявки
2011.03.08

(51) Int. Cl. A61K 31/122 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ Cdc7 ГРАНАТИЦИНА В

(31) 61/311,741

(32) 2010.03.08

(33) US

(43) 2013.02.28

(86) PCT/US2011/027619

(87) WO 2011/112635 2011.09.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЛОАН-КЕТТЕРИНГ ИНСТИТУТ
ФОР КЭНСЕР (US)

(72) Изобретатель:
Фраттини Марк, Джабалла Аким,
Келли Томас Дж. (US)

(74) Представитель:
Соболев А.Ю. (RU)

(56) US-A-5593970
SHIMBASHI A. ET AL.: "Synthesis of the naphthalene-derived inhibitors against Cdc25A dual-specificity protein phosphatase and their biological activity", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 15, no. 1, 3 January 2005 (2005-01-03), pages 61-65, XP025313458, ISSN: 0960-894X, DOI: DOI:10.1016/J.BMCL.2004.10.034 [retrieved on 2005-01-03], figure 1, page 61, right-hand column

JP-A-2005220037
STURDIK E. ET AL.: "THE CYTO TOXIC ACTION OF GRANATICIN A SULFHYDRYL REACTIVE ANTIBIOTIC ON EHRlich ASCITES

CARCINOMA CELLS", NEOPLASMA (BRATISLAVA), vol. 30, no. 1, 1983, pages 3-6, XP002635155, ISSN: 0028-2685, page 2, paragraph 2

HEINSTEIN P.: "MECHANISM OF ACTION OF GRANATICIN INHIBITION OF RIBOSOMAL RNA MATURATION AND CELL CYCLE SPECIFICITY", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 71, no. 2, 1982, pages 197-200, XP002635156, ISSN: 0022-3549, page 197, abstract, page 197, paragraph 1

CHANG C.J. ET AL.: "Identity of the antitumor antibiotic litmomycin with granaticin A.", THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS FEB 1975 LNKD-PUBMED:1112767, vol. 28, no. 2, February 1975 (1975-02), page 156, XP002635157, ISSN: 0021-8820, the whole document

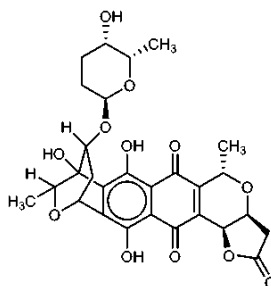
TANAKA N. ET AL.: "LACTOQUINOMYCIN A NOVEL ANTICANCER ANTIBIOTIC I. TAXONOMY ISOLATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY", JOURNAL OF ANTIBIOTICS (TOKYO), vol. 38, no. 10, 1985, pages 1327-1332, XP002635158, ISSN: 0021-8820, table 5

HUIQUN DENG ET AL.: "Practical procedures for genetic manipulation systems for medermycin-producing Streptomyces sp. AM-7161", JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY JUN 2010, LNKD-PUBMED:20143353, vol. 50, no. 3, 8 February 2010 (2010-02-08), pages 299-301, XP002635159, ISSN: 1521-4028, page 299, right-hand column, paragraph 2

NOMOTO K. ET AL.: "MECHANISM OF ACTION OF LACTOQUINOMYCIN A WITH SPECIAL REFERENCE TO THE RADICAL FORMATION", JOURNAL OF ANTIBIOTICS (TOKYO), vol. 41, no. 8, 1988, pages 1124-1129, XP002635160, ISSN: 0021-8820, page 1124, paragraph 1

DE-A1-4121468

(57) Изобретение относится к применению соединения формулы



гранатицина В (II) или его фармацевтически приемлемой соли, содержащей его фармацевтической композиции и набора для лечения или предотвращения различных видов рака у человека.

Предпосылки изобретения

Понимание того как геномы эукариот дублируются во время каждого клеточного цикла, является фундаментальной проблемой современной биологии и является одним из важнейших аспектов более общей проблемы понимания механизмов, контролирующих клеточную пролиферацию. Переход от G1- в S-фазу является главной решающей точкой для клетки и является предметом сложноорганизованных контролей, механизмы которых еще не изучены на молекулярном уровне (Bell, S.P. and A. Dutta (2002), *Annu Rev. Biochem.* 71: 333-74; Dutta, A. and S.P. Bell (1997), *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 293-332; Jallepalli, P.V. and T.J. Kelly (1997), *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(3): 358-63; Kelly, T.J. and G.W. Brown (2000), *Annu Rev Biochem*, 69: 829-80; Stillman, B. (1996), *Science*, 274(5293): 1659-64). Стабильность генома зависит от точного функционирования "переключателя репликации" ДНК, а также от надлежащего связывания репликации ДНК с другими событиями в клетке. Стало абсолютно ясно, что нарушение любого из этих механизмов может способствовать злокачественной опухоли (Sherr, C.J. (1996), *Science*, 274(5293): 1672-7).

В последнее десятилетие работа в ряде лабораторий позволила значительно продвинуться в понимании клеточной репликации ДНК (Bell, S.P. и A. Dutta, et al.; Kelly, T.J. и G.W. Brown, et al.). Анализ простых модельных систем, в частности *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Xenopus laevis*, привел к идентификации белков, которые действуют в точках начала репликации ДНК с инициацией синтеза ДНК. Значительным прорывом стало открытие Stillman и Bell комплекса узнавания точки начала репликации (ORC) шести субъединиц, который связывается с определенными точками начала репликации ДНК в *S.cerevisiae* и вовлекает дополнительные факторы инициации для формирования пре-репликационного комплекса (pre-RC). ORC был консервативным на протяжении эволюции эукариот (Chuang, R.Y., L. Chretien, et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 277(19): 16920-7; Gossen, M., D.T. Pak, et al. (1995), *Science*, 270(5242): 1674-7; Moon, K.Y., D. Kong, et al. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(22): 12367-12372; Rowles, A., J.P. Chong, et al. (1996), *Cell*, 87(2): 287-96; Vashee, S., P. Simancek, et al. (2001), *J. Biol. Chem.* 276(28): 26666-73). Теперь известно, что общий набор белков инициации собирается в точках начала репликации у всех эукариот и что активности этих белков регулируются специфичными протеинкиназами. Однако несмотря на этот прогресс, представления о биохимических механизмах инициации репликации ДНК эукариот остаются достаточно поверхностными.

Генетические исследования на дрожжах и биохимические исследования на *Xenopus* показали, что инициация репликации ДНК эукариот происходит в две стадии (Bell, S.P. и A.Dutta, et al.; Kelly, T.J. и G.W. Brown, et al.). На первой стадии, которая длится от поздней M- до G1-фазы клеточного цикла, pre-RC собираются в точках начала репликации ДНК. В начале S-фазы pre-RC активируются под действием двух гетеродимерных протеинкиназ, Cdc7-Dbf4 и циклинзависимой киназы S-фазы (S-CDK). Это событие отмечает переход ко второй стадии инициации, во время которой точка начала расплетается, и вовлекаются дополнительные белки для образования активных вилок репликации. Наличие активности циклинзависимой киназы (и, вероятно, других ингибирующих факторов) препятствует дальнейшей сборке pre-RC во время второй стадии реакции инициации. Этот механизм представляет собой "переключатель репликации", который гарантирует, что начала репликации ДНК запускаются только один раз за клеточный цикл, таким образом, сохраняется целостность генома.

Как отмечалось ранее, активация pre-RC требует активностей Cdc7-Dbf4 и S-CDK. Обе киназы активируются на границе G1/S, когда их соответствующие регуляторные субъединицы накапливаются до достаточных уровней, и обе, по всей видимости, связываются с pre-RC (Brown, G.W., P.V. Jallepalli, et al. (1997), *Proc. Natl. Acad. Set, USA*, 94: 6142-6147; Dowell, S.J., P. Romanowski, et al. (1994), *Science* 265(5176): 1243-6; Jallepalli, P.V. and T.J. Kelly; Jares, P. and J.J. Blow (2000), *Genes Dev.* 14(12): 528-40; Johnston, L.H., H. Masai, et al. (1999), *Trends Cell Biol.* 9(7): 249-52; Leatherwood, J., A. Lopez-Girona, et al. (1996), *Nature*, 379(6563): 360-3; Walter, J.C (2000), *Biol. Chem.* 275(50): 39773-8). Хотя регуляция активности S-CDK, как было показано, является достаточно сложной со спариванием нескольких циклиновых субъединиц с несколькими субъединицами Cdk, активность Cdc7 строго регулируется экспрессией субъединицы Dbf4, которая непосредственно регулируется с пиком экспрессии, наблюдаемым на границе G1/S (Bell, S.P. и A. Dutta, et al.). Активность Cdc7, как было показано, является достаточной для вхождения в S-фазу клеточного цикла.

Исследования на дрожжах показали, что клетки со сниженной активностью киназы переходят от G1- к M-фазе без вхождения в S-фазу, что приводит к клеточной смерти (Bell, S.P. и A. Dutta, et al.; Kelly, T.J. и G.W. Brown, et al.), и эмбриональные стволовые (ES) клетки условно нокаутной мыши по Dbf4, как недавно было показано, претерпевают блокировку S-фазы, что приводит к апоптозу при подавлении генной экспрессии (Yamashita, N., Kim, J.-M., et al. (2005), *Genes to Cells*, 10: 551-563). Генетические данные показали, что шестисубъединичный комплекс поддержания мини-хромосом (MCM2-7), предполагаемая геликазная активность, необходимая для расплетания в точке начала и инициации репликации ДНК (Bell, S.P. и A. Dutta, et al.; Kelly, T.J. и G.W. Brown, et al.), является мишенью регуляции киназой Cdc7-Dbf4, и белок Mct2 является прекрасным субстратом киназы Cdc7:Dbf4 *in vitro* (Sclafani, R.A. (2000), *Cell Sci.* 113(Pt 12): 2111-7). Белки MCM и Cdc7, как показали, являются сверхэкспрессированными при большинстве злокачественных опухолей, включая и солидные опухоли, и гемато-

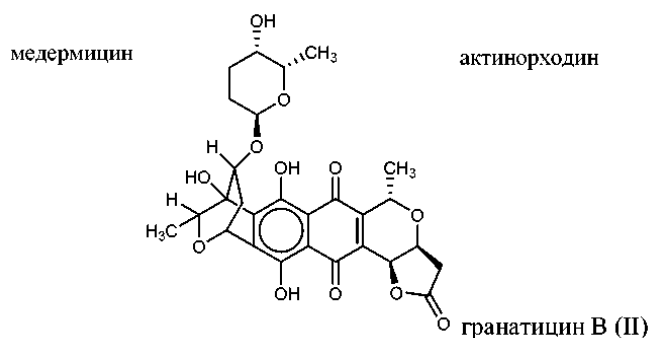
логические злокачественные новообразования (Hess, G.F., Drong, R.F., et al. (1998), *Gene* 211(1): 133-40; Velculescu, V.E., Madden, S.L., et al. (1999), *Nature Genetics*, 23: 387-88). Важными являются недавно полученные сведения о том, что сверхэкспрессия Cdc7 в образцах меланомы кожи была ассоциирована с высоким риском заболевания и устойчивости к химиотерапии (Nambiar, S., Mirmohammadsadegh, A., et al. (2007), *Carcinogenesis*, 12: 2501-2510). К тому же сверхэкспрессия Cdc7 также наблюдалась при агрессивной недифференцированной папиллярной карциноме щитовидной железы и при агрессивных злокачественных опухолях головы и шеи, что является положительным для папилломавируса человека (Fluge, O., Bruland, O., Akslen, L.A., et al. (2006) *Thyroid* 16 (2): 161-175; Slebos, R.J.C, Yi, Y., Ely, K., et al. (2006), *Clin Cancer Res* 12(3): 701-709). На самом деле, чувствительные аналитические системы разрабатываются в Европе и Соединенных Штатах Америки для выявления наличия белков MCM в моче пациентов с урогенитальным злокачественным новообразованием, а также у пациентов со злокачественной опухолью молочной железы, и это, как представляется, коррелирует с более агрессивным злокачественным новообразованием. Активность Cdc7 также является консервативной от жрожей до человека, что делает ее привлекательным кандидатом в качестве терапевтической цели. Логическая интерпретация этих данных заключается в том, что Cdc7:Dbf4 действительно является терапевтической целью.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение основывается на признании важной роли протеинкиназ, таких как Cdc7, и открытии ингибирования протеинкиназной активности известным классом соединений бензоизохроманхинонов (BIQ), таких как гранатицины. Было обнаружено, что гранатицины, в частности, ингибируют активность киназы Cdc на основе результатов, идентифицированных при высокопроизводительном скрининге (HTS) свыше 300000 соединений по их способности ингибировать гетеродимер киназы (Cdc7) и активатор (Dbf4), который фосфорилирует сериновый и треониновый остатки. Кроме того, было обнаружено, что гранатицины могут проявлять свойства, применимые в лечении пролиферативных нарушений, таких как злокачественная опухоль.

Гранатицины являются членами класса ароматических антибиотиков *Streptomyces*, известных как бензоизохроманхиноны (BIQ; Ichinose et al., *Actinomycetologica* (1998), 12: 99-109), которые также включают медеpmицин (также известный как лактохиномицин А) и актинорходин. Особенный интерес представляют химические модификации при C-10 через C-C связь либо путем гликозилирования (медеpmицин и гранатицин), либо путем димеризации (в актинорходине) (см., например, Hopwood, *Chem. Rev.* (1997), 97:2465-2497; Floss et al., *J Nat. Prod.* (1986), 49:951-70, Toral-Barza et al., *Mol. Cancer Ther.* (2007), 6:3028-3038 and Salaski et al., *J. Med. Chem.* (2009), 23:2181-2184), либо путем химической или ферментативной модификации 8-диола 3-метил-2-оксабидикло окт-5-ен-4,8-диольной группы гранатицина А (например, связывание углеводной или сахарной части), например, для получения соединений, таких как гранатицин В. Бензоизохроманхиноны, гранатицины и родственные природные продукты охвачены способами применения, фармацевтическими композициями и наборами, описанными в настоящем документе.

Соединение представляет собой гранатицин В:



или его фармацевтически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления соединения является ингибитором протеинкиназы; и ингибирование протеинкиназы применимо для лечения или предотвращения пролиферативного нарушения. В определенных вариантах осуществления протеинкиназой является киназа Cdc7 или регуляторная субъединица Dbf4 киназы Cdc7; и ингибирование киназы Cdc7 и субъединицы Dbf4 киназы Cdc7 применимо для лечения или предотвращения пролиферативного нарушения.

Пролиферативным нарушением является злокачественная опухоль. Злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза, острого мегакариобластного лейкоза или промиелоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого бифенотипического лейкоза, рака легких, рака яичников, рака щитовидной железы, или злокачественная опухоль содержит генетическую мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации RAS, мутации EGFR, мутации KRAS, мутации p53, мутации BRAF, мутации EVI1, мутации Flt-3, мутации WT-1, мутации циклина D, мутации PTEN, мутации ABL киназы и хромосомного нарушения, или злокачественной

опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль или рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль содержит генную мутацию. В определенных вариантах осуществления генная мутация включает мутацию RAS, мутацию EGFR, мутацию KRAS, мутацию p53, мутацию BRAF, мутацию EVI1, мутацию Flt-3, мутацию WT-1, мутацию циклина D, мутацию PTEN, мутацию ALB киназы или хромосомное нарушение.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одного вида терапии или терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает введение облучения.

Также представлена фармацевтическая композиция и наборы, применимые в любом из способов.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения поясняются в сопровождающих графических материалах и подробном описании. Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и из формулы изобретения.

Определения.

Соединения, применимые в настоящем изобретении, включают ингибиторы киназы Cdc7 и/или Dbf4. Определения специфических функциональных групп и химических выражений описаны более подробно ниже. Химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., внутренняя сторона, и специфические функциональные группы в целом определены, как описано там. Кроме того, общие принципы органической химии, а также специфические функциональные части и реакционная способность описаны в Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5 Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989 и Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Соединение, описанное в настоящем документе, может содержать один или несколько центров асимметрии и, таким образом, может существовать в различных изомерных формах, например энантиомеры и/или диастереомеры. Например, соединения, описанные в настоящем документе, могут иметь форму отдельного энантиомера, диастереомера или геометрического изомера или могут иметь форму смеси стереоизомеров, включая рацемические смеси и смеси, обогащенные одним или несколькими стереоизомерами. Изомеры могут быть выделены из смеси способами, известными специалистам в данной области, включая хиральную жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC), а также образование и кристаллизацию хиральных солей; или предпочтительные изомеры могут быть получены с помощью асимметрических синтезов. См., например, Jacques et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen et al., Tetrahedron, 33:2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962) и Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). Настоящее изобретение, кроме того, охватывает соединения как отдельные изомеры, в основном не содержащие других изомеров, так и, альтернативно, смеси различных изомеров.

Фраза "фармацевтически приемлемое производное", как используется в настоящем документе, означает любую фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир или соль такого сложного эфира такого соединения или любой другой аддукт или производное, которое при введении пациенту способно обеспечивать (непосредственно или косвенно) соединение, далее описанное в настоящем документе, или его метаболит, или остаток. Фармацевтически приемлемые производные, таким образом, включают, среди прочих, пролекарства.

Как используется в настоящем документе, выражение "фармацевтически приемлемая соль" относится к таким солям, которые по результатам медицинской оценки являются приемлемыми для применения в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., в соответствии с разумным соотношением пользы к риску. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в настоящем уровне техники. Например, Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, включенном в настоящий документ ссылкой. Фармацевтически приемлемые соли соединений, применимых в настоящем изобретении, включают полученные из приемлемых неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминогруппы, образованные неорганическими кислотами, такими как хлористо-водородная кислота, бромисто-водородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, применимых в настоящем уровне техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемле-

мые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионата, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, валерат и т.п. Соли, полученные из соответствующих оснований, включают соли щелочного металла, щелочно-земельного металла, аммония и $N^+(C_{1-4}\text{алкил})_4$ солей. Типичные соли щелочного и щелочно-земельного металла включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т.п. Другие фармацевтически приемлемые соли включают при необходимости нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низшего алкила сульфонат и арилсульфонат.

Кроме того, как используется в настоящем документе, выражение "фармацевтически приемлемый сложный эфир" относится к сложным эфирам, которые гидролизуются *in vivo* и включают такие, которые легко разрушаются в организме человека с получением исходного соединения или его соли. Приемлемые сложноэфирные группы включают, например, полученные из фармацевтически приемлемых алифатических карбоновых кислот, в частности алкановой, алкеновой, циклоалкановой и алкандиовой кислот, в которой каждая алкильная или алкенильная часть преимущественно содержит не более чем 6 атомов углерода. Примеры конкретных сложных эфиров включают формиаты, ацетаты, пропионаты, бутираты, акрилаты и этилсукцинаты.

Кроме того, выражение "фармацевтически приемлемые пролекарства", как используется в настоящем документе, относится к тем пролекарствам соединений, применимых в настоящем изобретении, которые по результатам медицинской оценки являются приемлемыми для применения в контакте с тканями людей и низших животных с чрезмерной токсичностью, раздражением, аллергической реакцией и т.п., в соответствии с разумным соотношением пользы к риску, и эффективными для их предназначенного применения, а также, если возможно, к цвиттер-ионным формам соединений, применимым в настоящем изобретении.

Выражение "пролекарство" относится к соединениям, которые легко трансформируются *in vivo* с образованием исходного соединения вышеупомянутой формулы, например, путем гидролиза в крови. Пролекарство является производным соединения, обычно со значительно сниженной фармакологической активностью, которое содержит дополнительную часть, которая поддается удалению *in vivo* с образованием исходной молекулы как фармакологически активных частиц. Примером пролекарства является сложный эфир или эфир, который расщепляется *in vivo* с образованием соединения интереса. Пролекарства различных соединений, а также материалы и способы получения производных из исходных соединений для создания пролекарств известны и могут быть применены в настоящем изобретении. Биологическая активность пролекарств и пролекарства также могут быть изменены путем добавления функциональной группы в соединение, что может быть катализировано ферментом. Также включены реакции окисления и восстановления, включая катализированные ферментом реакции окисления и восстановления. Всестороннее обсуждение пролекарств представлено в T. Higuchi and V. Stella, *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series и в Edward B. Roche, ed., *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, которые включены в настоящий документ ссылкой.

Как используется в настоящем документе, выражение "ингибировать" означает снижение количественного показателя киназной активности до уровня или количественного показателя, который статистически значительно ниже начального уровня, которым может быть исходный уровень киназной активности.

Как используется в настоящем документе, выражения "лечение", "лечить" и "обработка" относятся к обращению, облегчению, задержке наступления или ингибированию развития заболевания или нарушения или одного или нескольких его симптомов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лечение может быть применено после развития одного или нескольких симптомов. В других вариантах осуществления лечение может быть применено при отсутствии симптомов. Например, лечение может быть применено к восприимчивому индивидууму до наступления симптомов (например, с учетом истории развития симптомов и/или с учетом генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также может продолжаться после устранения симптомов, например, для предотвращения или задержки их повторения.

Как используется в настоящем документе, если не указано иное, выражения "предотвращать", "предотвращение" и "профилактика" предусматривает действие, которое происходит до того, как субъект начинает страдать от определенного заболевания или нарушения, которое ингибирует или снижает тяжесть заболевания или нарушения.

Выражения "вводить", "введение" или "применение", как используется в настоящем документе, относятся к имплантации, абсорбированию, приему внутрь, инъекции или ингаляции соединения.

Выражение "субъект" относится к любому животному. Субъект может находиться на любой стадии развития. "Субъект", которому предполагается введение, включает, без ограничения, людей (т.е. мужчин или женщин любой возрастной группы, например детей (например, младенца, ребенка, подростка) или взрослого субъекта (например, молодого человека, человека среднего возраста или пожилого человека)), и/или других приматов (например, яванского макака, макак-резусов); млекопитающих, включая коммерчески важных млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, козы, кошки и/или собаки; и/или птиц, включая коммерчески важных птиц, таких как куры, утки, гуси и/или индюки. В некоторых вариантах осуществления субъектом является грызун. В определенных вариантах осуществления субъектом является экспериментальное животное, такое как мышь, крыса, собака или отличный от человека примат. В определенных вариантах осуществления субъектом является трансгенное животное.

Выражение "пролиферативное нарушение", как используется в настоящем документе, относится к любому заболеванию, ассоциированному с нежелательной и/или аномальной пролиферацией клеток. Клетками может быть любой тип клеток, выявленный у субъекта. Пролиферация может быть обусловлена любой причиной (например, какая-либо генная мутация, какой-либо сигнал).

Терапевтически эффективное количество соединения означает вводимое количество, необходимое для достижения желаемого результата. Точное необходимое количество будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от видов, возраста, общего состояния субъекта, тяжести заболевания, конкретного противоракового средства, пути его введения, желаемого результата и т.п. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения "терапевтически эффективное количество" соединения или фармацевтической композиции является количеством, эффективным для ингибирования клеточной пролиферации у субъекта или в биологическом образце (например, в клетках).

В определенных вариантах осуществления клеточная пролиферация ингибируется приблизительно на 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 99%.

В определенных вариантах осуществления соединение ингибирует клеточную пролиферацию по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75% или по меньшей мере приблизительно на 90%.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения или композиции, достаточному для ингибирования клеточной пролиферации, или относится к количеству соединения или композиции, достаточному для снижения опухолевой нагрузки у субъекта.

В определенных вариантах осуществления опухолевая нагрузка снижается приблизительно на 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 99%.

В определенных вариантах осуществления опухолевая нагрузка снижается по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75% или по меньшей мере приблизительно на 90%.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения "терапевтически эффективное количество" соединения или фармацевтической композиции является количеством, эффективным для снижения или ингибирования роста опухолевых клеток и/или уничтожения опухолевых клеток.

Как используется в настоящем документе, "профилактически эффективное количество" соединения является количеством, достаточным для предотвращения заболевания или нарушения, или одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, или для предотвращения его рецидива. Профилактически эффективное количество соединения означает количество терапевтического средства, отдельно или в комбинации с другими средствами, которое обеспечивает профилактический эффект в предотвращении заболевания или нарушения. Выражение "профилактически эффективное количество" может охватывать количество, которое улучшает общую профилактику или усиливает профилактическую эффективность другого профилактического средства.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Роль Cdc7 в переходе от G1 к S-фазе: Схематическая диаграмма инициации репликации ДНК в клетках млекопитающих. Процесс можно поделить на несколько отдельных фаз: сборка, активация и удлинение. Во время сборки точка начала репликации ДНК (ori) связывается ORC1-6, комплексом узнавания точки начала репликации, который служит платформой для сборки пререпликационного комплекса (pre-RC) во время G1-фазы клеточного цикла. Это включает связывание аксессуарных белков Cdc6, Cdt1 и MCM2-7 белкового комплекса, который служит репликативной геликазой. При переходе G1/S-фаза pre-RC активируются и циклинзависимой киназой (CDK), и киназой Cdc7, что приводит к образованию вилки репликации. Образованная вилка включает рекрутинг белка, связывающего одноцепочечную ДНК, (RPA) и ДНК-полимеразы, необходимые для синтеза лидирующей и отстающей цепей. Регуляция Cdc6 и Cdt1 посредством фосфорилирования и сборки белкового комплекса с геминином, соответственно, ингибирует дальнейшую сборку функциональных pre-RC, обеспечивая целостность генома.

Фиг. 2. Элютриационный профиль PhALL3.1: Элютриационное центрифугирование применяли для синхронизирования недавно полученной клеточной линии острого лимфобластного лейкоза с наличием филадельфийской хромосомы (PhALL3.1). Асинхронизированную культуру (4 л) осаждали, повторно суспендировали в небольшом объеме (20 мл) и загружали в элютриационный ротор в соответствии с инструкциями изготовителя (Beckman). После уравнивания и промывания клеточные образцы элюировали из ротора на основе размера, причем меньшие клетки выходили из ротора в первую очередь. Десять фракций (250 мл) получили по градиенту и стандартный анализ FACS выполняли на 10 мл каждой фракции, проверяя содержание ДНК. Указывали популяции клеток на фазах G1, S и G2 в асинхронизированном профиле. Этот метод позволяет выделять клеточные популяции в определенной фазе.

Фиг. 3. Гранатицин А ингибирует переход от G1 к S-фазе: Гранатицин А индуцирует задержку клеточного цикла в клетках в G1-фазе. Клетки Ph-ALL3.1 подвергали стандартным условиям элютриационного центрифугирования и фракцию с G1-фазой, как определено с помощью анализа FACS (время ноль), выпускали в гранатицин А (1 мМ) или контроль с носителем (DMSO) на определенное время. Клеточные образцы после выпуска в гранатицин А или контроль с носителем (DMSO) возбуждали импульсами в течение 2 ч с Н-тимидином и образцы собирали, промывали и измеряли число импульсов в кислотном осадке сцинтилляционным методом. Ось x представляет время после выпуска в соединение или в контроль (в часах), а ось y представляет импульсы в минуту (CPM). На графике видно, что, тогда как контрольные клетки развиваются через нормальную S-фазу с пиком включения, как ожидалось от наблюдаемого профиля клеточного цикла, в обработанных гранатицином А образцах остановилось включение ³H-тимидина с профилями клеточного цикла, показывающими задержку G1-фазы. Это означает, что существует полный блок вхождения в S-фазу (и активируется запуск точки начала) в популяции G1, что отвечает ингибированию активности киназы Cdc7.

Фиг. 4. Гранатицин А индуцирует опосредованный каспазой 3 апоптоз: Через 10 ч после выпуска синхронизированных по G1 клеток PhALL3.1 либо в контроль (DMSO), либо в гранатицин А отбирали образцы клеток и измеряли активность каспазы 3 с использованием стандартного флуориметрического анализа, как описано в Gao et al., "Dimeric Smac/Diablo Peptide Directly Relieves Caspase-3 Inhibition by XIAP" Journal Biological Chemistry (2007), 282:30718-30727.

Фиг. 5. Гранатицин А индуцирует задержку и апоптоз в клетках в S-фазе: Гранатицин А индуцирует задержку клеточного цикла и апоптоз в клетках в S-фазе. Клетки Ph-ALL3.1 подвергали стандартным условиям элютриационного центрифугирования и фракцию в S-фазе, как определено анализом FACS, выпускали в гранатицин А (1 мкМ) или в контроль с носителем (DMSO) на определенное время и выполняли анализ FACS. Показаны профили FACS с содержанием ДНК на оси x и числом клеток на оси y, демонстрирующие ход клеточного цикла в контрольных образцах и задержку в обработанных гранатицином А образцах с последующим апоптозом, поскольку подфракция G1 увеличивается со временем. Апоптоз далее подтверждали в дополнительных независимых экспериментах. "Асинхронизированные" и "время ноль" соответствуют образцу асинхронизированных клеток и промытой фракции в S-фазе до выпуска соответственно.

Фиг. 6. Включение тимидина в S-фазе: Включение ³H-тимидина во время эксперимента с выпуском описано в слайде выше. Клеточные образцы после выпуска в гранатицин А или в контроль с носителем (DMSO) возбуждали импульсами в течение 2 ч с Н-тимидином, образцы собирали, промывали и число импульсов в кислотном осадке измеряли сцинтилляционным методом. Ось x представляет время после выпуска в соединение или в контроль (в часах), а ось y представляет импульсы в минуту (CPM). На графике видно, что, тогда как контрольные клетки развиваются через нормальную S-фазу с пиком включения, как ожидалось от наблюдаемого профиля клеточного цикла, обработанные гранатицином А образцы сначала демонстрируют заметно пониженное включение и в конечном счете прекращают включение ³H-тимидина с профилями клеточного цикла, что показывает задержку S-фазы. Это означает, что ингибируется не только поздний запуск точки начала, но также гранатицином А ингибируется образование репликационной вилки.

Фиг. 7. Гранатицин А ингибирует фосфорилирование Mcm2: После синхронизации в S-фазе и выпуска клетки PhALL3.1 из экспериментов фиг. 5 и 6 собирали в определенное время после выпуска либо в контроль (DMSO), либо в гранатицин А и экстракты подвергали вестерн-блоттингу для выявления общего белка Mcm2. Этот блот показывает ингибирование фосфорилирования Mcm2 уже через 2 ч после выпуска в гранатицин А и подтверждает мишеневое ингибирование гранатицином А в клетке.

Фиг. 8. Фосфорилирование Mcm2 с помощью Cdc7: Фосфорилированные формы Mcm2 быстрее мигрируют в SDS-PAGE гелях. Стандартные *in vitro* киназные реакции выполняли с использованием высокоочищенных рекомбинантных Cdc7 и Mcm2 человека в присутствии радиоактивного АТФ и продукты разделяли на SDS-PAGE гелях, окрашенных серебром, и выполняли автордиографию для выявления фосфорилированных форм Mcm2. Контроль является отрицательным контролем по киназной активности, DMSO является положительным контролем по киназной активности, гранатицин А является малой молекулой-ингибитором активности киназы Cdc7.

Фиг. 9. Гранатицин А индуцирует задержку клеточного цикла в клетках HeLa S3: Клетки HeLa S3 (карцинома шейки матки) синхронизировали при переходе G1/S с использованием стандартного двойного тимидинового блока и выпуска. Синхронизированные клетки (время ноль) выпускали в среду, содержащую гранатицин А, на определенное время и выполняли стандартный анализ FACS с учетом содержания ДНК. Это исследование показывает, что в клетках HeLa также блокируется ход S-фазы под воздействием гранатицина А.

Фиг. 10. Гранатицин В индуцирует задержку клеточного цикла HeLa S3: Выполняли эксперимент, идентичный описанному на фиг. 9, с использованием гранатицина В и получили подобные результаты.

Фиг. 11. Задержка клеточного цикла в клетках HeLa S3: Морфологическое проявление клеток HeLa S3, обработанных контролем (DMSO), гранатицином А и гранатицином В, после 15 ч выпуска из двойного тимидинового блока. Тогда как контрольные клетки выглядят нормальными и здоровыми, обработанные гранатицином А клетки являются заторможенными с уплощенной морфологией и перинуклеарной вакуолизацией, что соответствует индукции апоптоза. Этот фенотип больше выражен у обработанных гранатицином В клеток, что выглядит как образование пузырьков в ядре и клеточная смерть. Показаны соответствующие профили FACS.

Фиг. 12-14. Ингибирование индуцированной гранатицином А каспазы-3 активности в клетках HeLa. Строили кривые возрастания в присутствии отображенных микромолярных концентраций гранатицина А и измеряли активность каспазы-3 после добавления субстрата, который при расщеплении каспазой-3 дает световое излучение, которое количественно определяется флуориметром (ось y) как функция времени (ось x). Фиг. 12: клетки HeLa отдельно; фиг. 13: сверхэкспрессия Bcl-XL клеток HeLa; и фиг. 14: сверхэкспрессия Bcl-XL клеток HeLa в присутствии 10 микромолярного Ac-DEVD-CHO (пептид-альдегид ингибитор каспазы-3), демонстрирующего активацию каспазы-3, и апоптоз в обработанных гранатицином А клетках HeLa, который преодолевается и сверхэкспрессией Bcl-XL, и химическим ингибированием активности каспазы-3.

Фиг. 15. Гранатицин А не активирует контрольную точку S-фазы в клетках HeLa: Воздействие на клетки HeLa гранатицина А не активирует контрольную точку S-фазы и приводит к усилению нарушений двухцепочечной ДНК. Клетки HeLa инкубировали в присутствии гранатицина А или носителя контроля (DMSO) определенное время и цельноклеточные экстракты подвергали SDS-PAGE и анализу вестерн-блоттинга. Asyn = асинхронизированно растущие клетки HeLa. HU = клетки HeLa, подверженные воздействию гидроксимочевина в течение определенного времени. HU применяли в качестве контроля повреждающего ДНК средства, которое, как известно, ингибирует ответ контрольной точки на повреждение ДНК. Опять-таки, наблюдали, что подвижность Mcm2 смещается в клетках, обработанных гранатицином А. Подвижность Mcm2 не зависит от HU. Активация контрольной точки повреждения/репликации ДНК коррелирует с зависимым от ATM/ATR фосфорилированием Chk1 в Ser345. Уровни Chk1 Ser345 ниже пределов выявления, что указывает на то, что при ингибировании Cdc7 контрольная точка репликации ДНК либо неэффективно активируется, либо сохраняется и что ингибиторные сигналы, препятствующие продвижению клеток в клеточный цикл, могут не образовываться.

Фиг. 16А, 16В. Гранатицин А и гранатицин В ингибируют множественные типы опухолей: Обозначенные клеточные линии и образцы первичного пациента тестировали с соединениями, перечисленными в стандартных анализах цитотоксичности (эффект дозы 12 точек с использованием обработки Alamar blue в качестве индикатора жизнеспособности клеток). Анализы выполняли в трех повторностях и определения IC₅₀ проводили в 12-точечных серийных разбавлениях от 10 мМ до 5 нМ. Значения IC₅₀ представлены более темными оттенками, показывающими низкие наномолярные значения, а высокие микромолярные значения - более светлыми оттенками, соответственно. На фиг. 16А и 16В кратко изложены определения IC₅₀ для гранатицина А и гранатицина В, а также производных 1 и 2 (фиг. 16А) против нескольких клеточных линий немелкоклеточного рака легкого, клеточных линий злокачественной опухоли яичника, клеточных линий мезотелиомы, саркомы и меланомы, включая клетки, выделенные из образцов первичного пациента глазной меланомы (124859-А и -SB). Включены клеточные линии, содержащие мутации *ras* и EGFR gatekeeper, в дополнение к линиям p53 мутантных клеток и другим известным устойчивым к химиотерапии клеточным линиям. В частности, включены клеточные линии с фенотипом

устойчивости к нескольким лекарственным средствам (MDR-сверхэкспрессирующих) из множества линий клеток гематологических и солидных опухолей. В табл. 2, представленной в данном документе, показаны данные фиг. 16B (см. примеры). Табл. 1 показывает серии образцов первичных пациентов с лейкозом, острым и хроническим, и не получавших лечения и невосприимчивых к лечению, тестированные по отношению к гранатицинам А и В и производным 1 и 2 (см. примеры). Фиг. 16А и 16В и табл. 1, 2 вместе показывают, что гранатицин А, производные 1 и 2, а особенно гранатицин В, обладают широким спектром активности по отношению к множеству линий опухолевых клеток и в образцах первичных пациентов от пациентов с хроническим и острым лейкозами, не получавших лечения и не восприимчивых к химиотерапии.

Фиг. 17. Линия клеток острого лимфоцитарного лейкоза t(9;22)(q34;q11): На основе результатов анализов цитотоксичности выбирали гранатицин А и гранатицин В для проведения исследований на мышцах с использованием модели мыши Ph-ALL3.1. Клеточную линию PhALL3.1 ретровируально трансдуцировали конструктором экспрессии GFP-люциферазы светлячка с использованием стандартных методов. Инфицированные клетки сортировали с помощью FACS для совместной экспрессии CD 19 и GFP. Панель А представляет профиль FACS клеток перед трансдукцией, а панель В представляет профиль FACS клеток после трансдукции, демонстрируя дважды позитивные по CD19-GFP клетки, которые затем применяли для инъекции иммунокомпрометированным мышам SCID-Beige. Клетки Ph⁺ ALL выделяли из плевральной жидкости пациента, которого лечили в Leukemia Service, и применяли для создания клеточной линии, которая легко росла в культуре. Цитогенетические показатели подтверждали кариотипом, FISH, RT-ПЦР и анализом вестрен-блоттинга по p190 bcr-abl. Затем клеточную линию трансдуцировали ретровирусным конструктором GFP-люциферазы светлячка. Показали, что гранатицин А был очень активным по отношению к этой клеточной линии в клеточных анализах.

Фиг. 18А-18В. Выживаемость мыши после инокуляции опухолевых клеток: 5 млн опухолевых клеток PhALL3.1 инъецировали в хвостовые вены группе из восьми иммунокомпрометированных мышей SCID-Beige и контролировали развитие заболевания в определенные дни с использованием *in vivo* биолюминесцентной визуализации. На фиг. 18А показано, что эта мышинная модель острого лимфобластного лейкоза человека точно повторяет видимое развитие заболевания человека. На фиг. 18В показано, что при отсутствии обработки эти мыши отвечают критерию эвтаназии на день 41, что указывает на быстрое развитие и летальность лейкоза.

Фиг. 19А-19В. Гранатицин А ингибирует рост PhALL3.1 *in vivo*: Используя модель мышей SCID-Beige внутриперитонеальной опухоли PhALL3.1, мышей внутриперитонеально обрабатывали контролем с носителем (DMSO) или определенными дозами гранатицина А в дни 3, 6, 9 и 12. Показаны *in vivo* биолюминесцентная визуализация в день 16 (фиг. 19А) и количественное определение объема опухоли (фиг. 19В), а также показано 90% снижение объема опухоли в день 16 у мышей, обработанных самой высокой дозой (3,0 мг/кг). Отдельные данные некропсии показали незначительную (степень 2 или выше) токсичность для органов у всех обследованных мышей на каждом уровне дозы.

Фиг. 20А-20С. Гранатицин В ингибирует рост Ph-ALL3.1 *in vivo*: Учитывая быстрый внутривенный клиренс гранатицина А печенью, гранатицин В использовали в эксперименте непрерывной инфузии с животной моделью PhALL3.1. Диффузионные насосы, содержащие гранатицин В, имплантировали хирургическим путем в боковую сторону 5 группам мышей в день +3 после инъекции 5 млн клеток в хвостовые вены и лекарственному средству (или контролю - С-DMSO) при определенной концентрации позволили диффундировать в течение семи дней до удаления насоса. В день 12 получили изображение мышей (фиг. 20А, 20В) и рассчитали объем оставшейся опухоли (фиг. 20С). Наблюдали 95% уменьшение опухоли при самой высокой дозе. Мыши переносили процедуру без очевидной токсичности для органов, как видно из некропсии, и показано, что гранатицин В достаточно стабилен при внутривенном введении с достижением эффективности по отношению к этой модели летальной опухоли.

Фиг. 21. Исследование стабильности гранатицина В при сравнении НР/МР: Проводили стандартные исследования стабильности в плазме с гранатицином В. Утилизацию гранатицина В измеряли масс-спектрометрией.

Фиг. 22А-22С. Гранатицин В является эффективным по отношению к нескольким солидным опухолям: Гранатицин В является эффективным по отношению к мышинным моделям меланомы (фиг. 22А), немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого (фиг. 22В) и злокачественной опухоли яичника (фиг. 22С). Для экспериментов со злокачественной опухолью яичника мышей SCID-Beige инъецировали 5 млн клеток OVCAR3, которые были трансдуцированы плазмидой экспрессии GFP-люциферазы светлячка (Frattini, M.G. и Brentjens, R.J., неопубликованные данные). Затем эти клетки инъецировали внутриперитонеально 4 группам мышей в день 1. С дней 7-14 мышей инъецировали ежедневно определенными концентрациями гранатицина В во внутрибрюшинную область. Осуществляли визуализацию (люциферазная активность) в день 42 и, главным образом, обнаруживали отсутствие заболевания у мышей, обработанных 3 мг/кг гранатицина В. Для моделей меланомы и немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого применяли клетки SKMEL-28 и A459 соответственно в стандартных экспериментах ксе-нотрансплантации у бестимусных мышей. Бестимусных мышей обрабатывали гранатицином В 2,5 мг/кг/сутки непрерывным путем с использованием осмотических диффузионных насосов. Показаны

срезы обработанных ксенотрансплантатов после эвтаназии в день 28 и окрашивания Н&Е. В контрольных срезах не выявлены некроз или клеточная смерть (не показано).

Фиг. 23А-23С. Гранатицин А и В не являются цитотоксичным по отношению к нормальным диплоидным клеткам.

Фиг. 23А, 23В. Воздействие гранатицина В не является цитотоксичным по отношению к нормальным диплоидным клеткам. Инкубировали клетки либо HeLa, либо RPE (ретинальные пигментные эпителиальные клетки, линия нормальных диплоидных клеток человека) в носителе-контроле (DMSO) или в гранатицине В (1 мкМ) в течение 24 ч и образцы подвергали стандартному анализу FACS с содержанием ДНК, показанным на оси х (фиг. 23А). Воздействие гранатицина В существенно не влияет на профиль клеточного цикла для клеток RPE, тогда как профиль клеточного цикла клеток HeLa показывает апоптическую смерть клеток с увеличением содержащих ДНК клеток в суб-G1 и утрату развития нормального клеточного цикла. Экстракты из клеток в определенное время, на которые воздействовали либо DMSO, либо гранатицином В (1 мкМ), применяли в стандартных анализах активности каспазы-3 для контролирования индукции апоптоза, и показали, что каспаза-3 активируется только в клетках HeLa, на которые воздействовали гранатицином В (фиг. 23В). Воздействие гранатицина В не приводит к активации каспазы-3 в клетках RPE.

Фиг. 23С. Воздействие гранатицином А не является цитотоксичным по отношению к нормальным диплоидным клеткам. Инкубировали клетки либо HeLa, либо RPE (ретинальные пигментные эпителиальные клетки, линия нормальных диплоидных клеток человека) в носителе-контроле (DMSO) или в гранатицине А в течение 24 ч и образцы подвергали стандартному анализу FACS с FL2, показывающим содержание ДНК. Воздействие гранатицина А не влияет на профиль клеточного цикла для клеток RPE, тогда как профиль клеточного цикла клеток HeLa показывает апоптическую смерть клеток с увеличением содержащих ДНК клеток в суб-G1.

Фиг. 24А, 24В. Гранатицин В является очень эффективным по отношению к клеткам Joke-2. Линию клеток Joke-2 получили от пациента с положительным по филадельфийской хромосоме острым лимфобластным лейкозом (Ph-ALL). Пациент был клинически устойчивым к иматинибу мезилату, и киназа Bcr-Abl, как обнаружили, обладала следующими с высокой степенью риска устойчивости мутациями в домене киназы Abl (F317L, F359V, T315I и E255K).

Фиг. 24А. Клетки Joke-2 выращивали в присутствии контроля DMSO или гранатицина В (1 мкМ) в течение определенного времени и измеряли жизнеспособность после окрашивания клеточного образца в трипановом синем (Sigma-Aldrich).

Фиг. 24В. Применяли экстракты из клеток в определенное время, на которые воздействовали либо DMSO, либо гранатицином В (1 мкМ) в стандартных анализах активности каспазы-3 для контролирования индукции апоптоза и показали, что каспаза-3 активируется только в клетках, на которые воздействовали гранатицином В.

Подробное описание конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения

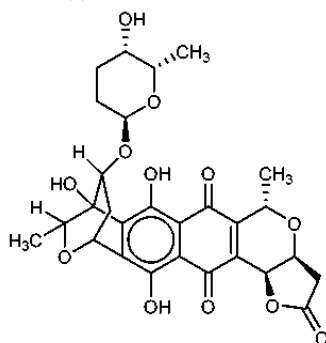
Данное изобретение вытекает из открытия, что бензоизохроманхиноны (BIQ), такие как гранатицины, ингибируют активность протеинкиназы. Обнаружили, что гранатицины, в частности, ингибируют активность киназы Cdc на основе пиков, установленных высокопроизводительным скринингом (HTS) более 300000 соединений на их способность ингибировать гетеродимер киназы (Cdc7) и активатор (Dbf4), который фосфорилирует остатки серина и треонина.

Настоящее изобретение обеспечивает способы ингибирования активности протеинкиназы, такой как активность киназы Cdc, и особенно, активность киназы Cdc7.

Ингибирующие соединения, применимые в способах, включают гранатицин В. Способы настоящего изобретения применимы в лечении связанных с киназой заболеваний или нарушений. В частности, способы применимы в лечении пролиферативных нарушений, таких как злокачественные опухоли, доброкачественные опухоли, воспалительные нарушения и их осложнения. Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции и наборы для лечения различных заболеваний.

Соединения, применимые в настоящем изобретении

Настоящее изобретение использует соединение



или его фармацевтически приемлемую соль.

Соединение, описанное в настоящем документе, можно применять в способах, фармацевтических композициях и наборах, например, при лечении и предупреждении пролиферативных нарушений, таких как злокачественная опухоль, доброкачественные опухоли, воспалительные нарушения и их осложнения.

Протеинкиназы, Cdc7 и Dbf4.

Соединения, применимые в настоящем изобретении, представляют собой ингибиторы протеинкиназ. Протеинкиназы образуют группу ферментов, которые катализируют фосфорилирование гидроксигрупп специфических белковых остатков, таких как остатки тирозина, серина или треонина. Указанные фосфорилирования могут сильно модифицировать функцию белков; таким образом, протеинкиназы играют важную роль в регуляции большого разнообразия клеточных процессов, особенно включая метаболизм, клеточную пролиферацию, клеточную дифференцировку или выживание клеток. Среди различных клеточных функций, в которые включена активность протеинкиназы, конкретные процессы представляют аттрактивные цели для лечения конкретных заболеваний. В качестве примера можно особенно указать ангиогенез и контроль клеточного цикла, в котором протеинкиназы могут играть важную роль. Эти процессы важны для роста солидных опухолей, а также для развития других заболеваний.

Протеинкиназы участвуют в сигнальных событиях, которые контролируют активацию, рост и дифференцировку клеток в ответ как на внеклеточные медиаторы, так и на изменения окружающей среды. В основном эти киназы относятся к двум группам: те, которые фосфорилируют предпочтительно остатки серина и/или треонина, и те, которые фосфорилируют предпочтительно остатки тирозина (S.K. Hanks and T. Hunter, FASEB. J., 1995, 9, pages 576-596). Серин/треонинкиназы, например, представляют собой изоформы протеинкиназ C (A.C. Newton, J. Biol. Chem., 1995, 270, pages 28495-28498) и группу циклинзависимых киназ, таких как Cdc2 (Cdk1) (J. Pines, Trends in Biochemical Sciences, 1995, 18, pages 195-197). Тирозинкиназы включают рецепторы фактора роста, такие как рецептор эпидермального фактора роста (EGF) (S. Iwashita and M. Kobayashi, Cellular Signalling, 1992, 4, pages 123-132), и цитозольные киназы, такие как p56lck, p59fyn, ZAP-70, и csk киназы (C. Chan et al., Ann. Rev. Immunol., 1994, 12, pages 555-592).

Чрезмерно высокие уровни протеинкиназной активности связывали со многими заболеваниями, приводя в результате к атипичным клеточным функциям. Это может происходить или непосредственно, или опосредованно в результате нарушения механизмов контроля киназной активности, связанного, например, с мутацией, сверхэкспрессией или некорректной активацией фермента, или со сверхпродукцией или недопродукцией цитокинов или факторов роста, которые также задействованы в сигнальной трансдукции до или после киназ. Во всех этих случаях селективное ингибирование действия киназ дает надежду на благоприятный эффект. Среди этих протеинкиназ можно указать совершенно конкретную протеинкиназу Cdc7. Cdc7 представляет собой серин/треониновую киназу, которая охарактеризована на молекулярном уровне как фактор, который необходим для инициации репликации ДНК.

Каталитическая активность Cdc7, которая консервативна у всех эукариот, зависит от ее регуляторной субъединицы Dbf4. Хотя экспрессия Cdc7 (при уровне информационной РНК и РНК-белка) постоянна во всем клеточном цикле, уровень экспрессии Dbf4, в отличие от этого, зависит от клеточного цикла, который индуцирует увеличение активности киназы Cdc7 во время G1-S перехода. По этой причине Cdc7 дали обозначение DDK (Dbf4-зависимая киназа).

Основная активность комплекса Cdc7/Dbf4 наблюдается при инициации репликации ДНК во время S-фазы. Она фосфорилирует MCM2, что, таким образом, активирует комплекс MCM (поддержания митохондриосом), который является важным компонентом ДНК-геликазной активности.

Cdc7 также играет важную роль в мутагенезе, главным образом индуцируемом действием на уровне путей и контрольных точек, связанных с повреждением ДНК, в частности в ATR-зависимой контрольной точке, которая предотвращает инициацию репликации ДНК в ответ на повреждение одноцепочечного типа, вызванного химическими средствами, такими как этопозид.

Cdc7 и Dbf4 сверхэкспрессируются в линиях опухолевых клеток человека и во многих образцах опухоли (легкое, молочная железа, щитовидная железа, ободочная кишка-прямая кишка, пищевод, матка, яичко, печень) по сравнению с соответствующими нормальными тканями (Hess, G.F., Drong, R.F. et al., 1998).

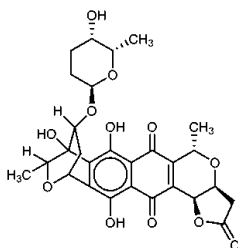
Эксперименты по супрессии экспрессии Cdc7 с помощью технологии РНК-интерференции (РНК-и) демонстрируют, что ингибирование экспрессии Cdc7 индуцирует блокировку клеточного цикла и предупреждает клеточную пролиферацию линий опухолевых клеток человека HeLa и HCT116, но оказывает ограниченный эффект на нормальные клетки (нормальные фибробласты кожи человека). Это отражено в продолжительной задержке в G1, что вызывает апоптоз в клетках, недостающих p53 (>50% опухолей), но обратимо в нормальных клетках.

Ингибиторы активности киназы Cdc7 могут составлять новую категорию целевой цитотоксической терапии, а также ингибиторов ДНК репликации. Такие ингибиторы будут ингибировать репликацию перед тем, как установятся вилки репликации, таким образом блокируя репликацию без повреждения ДНК. Данное изобретение, таким образом, относится, в частности, к новым ингибиторам протеинкиназы Cdc7, которые можно использовать особенно для лечения атипичной клеточной пролиферации и, более кон-

кретно, в онкологии.

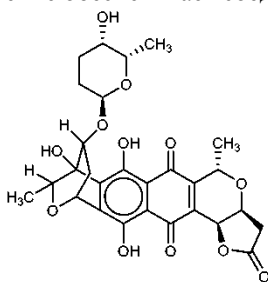
Способы лечения.

Способы включают применения соединения формулы



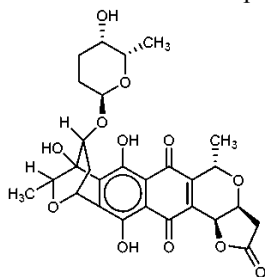
или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение формулы



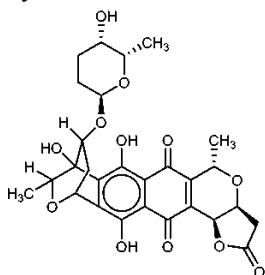
или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении или предотвращении пролиферативного нарушения.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного препарата для лечения или предотвращения пролиферативного нарушения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предотвращения пролиферативного нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, где субъекту вводят терапевтически эффективное количество соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

В определенных вариантах осуществления соединение индуцирует апоптоз. В определенных вариантах осуществления соединение индуцирует блокировку S-фазы.

В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой ингибитор протеинкиназы; где ингибирование протеинкиназы применяют для лечения или предотвращения пролиферативного нарушения. В определенных вариантах осуществления протеинкиназой является киназа Cdc7 или регуляторная субъединица Dbf4 киназы Cdc7, где ингибирование киназы Cdc7 или регуляторной субъединицы Dbf4 киназы Cdc7 применяют для лечения или предотвращения пролиферативного нарушения. В некоторых вариантах осуществления ингибитором протеинкиназы является ингибитор киназы Cdc7 или регуляторная субъединица Dbf4 киназы Cdc7.

Пролиферативным нарушением является злокачественная опухоль. Злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза, острого мегакариобластного лейкоза или промиелоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого бифенотипического лейкоза, рака легких, рака яичников, рака щитовидной железы, или злокачественная опухоль содержит генетическую мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации RAS, мутации EGFR, мутации KRAS, мутации p53, мутации BRAF, мутации EVI1, мутации Flt-3, мутации WT-1, мутации циклина D, мутации PTEN, мутации ABL киназы и хромосомного нарушения, или злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль или рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль. Рецидивная злокачественная опухоль относится к злокачественной опухоли, которая возвращается после того, как пациент ощутил ремиссию. Рефрактерная злокачественная опухоль относится к злокачественной опухоли, которая не отвечает на другие терапии или терапевтические средства. В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является устойчивая (т.е. не отвечает) к терапиям или химиотерапевтическим средствам. В определенных вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль является устойчивой к терапиям или химиотерапевтическим средствам.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является гематологическая злокачественная опухоль. В определенных вариантах осуществления соединение ингибирует рост гематологических злокачественных опухолей. В определенных вариантах осуществления соединение ингибирует рост гематологических злокачественных опухолей с IC_{50} в наномолярном диапазоне. В определенных вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой гематопозитическую злокачественную опухоль лимфоидного роста. В определенных вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой рецидивную и/или рефрактерную гематопозитическую злокачественную опухоль лимфоидного роста. В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является от рефрактерной до имеющей много циклов терапии злокачественная опухоль (например, включая аллогенную пересадку костного мозга). В определенных вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой рецидивную и/или рефрактерную ALL, CLL, AML или CML.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является злокачественная опухоль легкого. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль легкого представляет собой немелкоклеточную злокачественную опухоль легкого. В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью легкого является мелкоклеточная злокачественная опухоль легкого. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль легкого представляет собой аденокарциному легкого.

В определенных вариантах осуществления злокачественной опухолью является солидная опухоль. В определенных вариантах осуществления соединение ингибирует рост солидных опухолей. В определенных вариантах осуществления соединение ингибирует рост солидных опухолей с IC_{50} в наномолярном диапазоне.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает генную мутацию.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает мутацию RAS. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает RAS дикого типа.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает мутацию EGFR. В определенных вариантах осуществления мутация EGFR является мутацией L858R EGFR. В определенных вариантах осуществления мутация EGFR является мутацией DelE746 EGFR. В определенных вариантах осуществления мутация EGFR является мутацией DelE746-A750 EGFR. В определенных вариантах осуществления мутация EGFR является мутацией DelE746-E749 EGFR. В определенных вариантах осуществления мутация EGFR является мутацией T790M EGFR. В определенных вариантах осуществления мутация EGFR является мутацией T790M/L858R EGFR. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает EGFR дикого типа.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает мутацию KRAS. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает G13C KRAS мутацию. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает G12C KRAS мутацию. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает G12C KRAS мутацию. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает Q61H KRAS мутацию. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает KRAS дикого типа.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает мутацию p53. В определенных вариантах осуществления p53 мутация представляет собой R273H p53 мутацию. В определенных вариантах осуществления p53 мутация представляет собой G262V p53 мутацию. В определенных вариантах осуществления p53 мутация представляет собой G16L p53 мутацию.

В определенных вариантах осуществления p53 мутация представляет собой C176F p53 мутацию.
 В определенных вариантах осуществления p53 мутация представляет собой M246I p53 мутацию.
 В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает p53 дикого типа.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает BRAF мутацию.
 В определенных вариантах осуществления BRAF мутация представляет собой BRAF V600E мутацию.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает EVI1 мутацию.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает Flt-3 мутацию.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает WT-1 мутацию.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает мутацию циклина D.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает PTEN мутацию.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает мутацию киназы ABL.

В определенных вариантах осуществления мутация включает хромосомное нарушение. В определенных вариантах осуществления хромосомное нарушение представляет собой делецию или инверсию хромосом. В конкретных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает делецию хромосомы 17p. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает инверсию хромосомы 16. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает трисомию хромосомы 8. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает моносомию хромосомы 7. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает аномалию хромосомы 11q23. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает положительную аномалию филадельфийской хромосомы.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль включает слитый транскрипт. В определенных вариантах осуществления слитый транскрипт является реципрокным ASPL-TFE3 слитым транскриптом.

Анализы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ определения эффекта дозы, используя анализ на цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способ исследования осуществляемого эффекта дозы, который включает этапы получения тестового соединения, контактирования тестового соединения с клеткой и инкубирования клетки с соединением при подходящих условиях, чтобы определить цитотоксичность соединения. Антипролиферативную активность тестового соединения можно затем оценить, используя способ, известный специалисту в данной области техники. Этот процесс можно затем повторить, используя различные концентрации тестового соединения для вычисления IC₅₀. В определенных вариантах осуществления тестовое соединение является неким соединением. В определенных вариантах осуществления клетки являются клетками ретинобластомы.

В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением (например, неким соединением) в течение от приблизительно 1 мин до приблизительно 1 недели. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 1 ч до приблизительно 1 недели. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 12 ч до приблизительно 1 недели. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 24 ч до приблизительно 1 недели. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 36 ч до приблизительно 1 недели. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 48 ч до приблизительно 1 недели. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 48 до приблизительно 120 ч. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 48 до приблизительно 96 ч. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение от приблизительно 62 до приблизительно 82 ч. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение приблизительно 72 ч. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с тестовым соединением в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней.

В определенных вариантах осуществления через определенное количество времени (например, 72 ч) добавили индикатор жизнеспособности клеток (например, Alamar Blue) и смесь инкубировали в течение дополнительного периода времени. В некоторых вариантах осуществления этот дополнительный период времени находится в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 48 ч. В некоторых вариантах осуществления этот дополнительный период времени находится от приблизительно 12 до приблизительно 36 ч. В некоторых вариантах осуществления этот дополнительный период времени составляет приблизительно 24 ч.

Ингибирование клеточной пролиферации можно измерить, используя способы или технологию, известные на настоящем уровне техники. В некоторых вариантах осуществления ингибирование клеточной пролиферации измеряют, используя вещество, которое производит обнаружимый сигнал, пропорциональный величине ингибирования клеточной пролиферации. В некоторых вариантах осуществления ин-

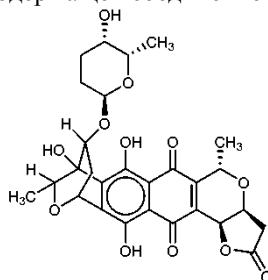
гибирование клеточной пролиферации количественно определяют, используя один из любых индикаторов, известных специалисту в данной области техники, который производит количественно определяемый сигнал, интенсивность которого обнаружима и пропорциональна величине ингибирования. В некоторых вариантах осуществления ингибирование клеточной пролиферации количественно определяют, используя индикатор, который флуоресцирует. Типичные индикаторы включают Tyramide-Alexa Fluor 488, Alamar Blue et al.

В некоторых вариантах осуществления эффективность соединения определяют измерением размера опухоли за период времени перед, во время и/или после лечения указанным соединением. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют дважды в неделю. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют каждый день. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют раз в день. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют дважды в день. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют один раз в два дня. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют один раз каждые три дня. В определенных вариантах осуществления размер опухоли измеряют с промежутками, как требуется любым из способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления размер опухоли измеряют внешне дважды в неделю циркулем. В определенных вариантах осуществления размер опухоли измеряют раз в неделю, используя технику визуализации (например, МРТ, рентгеновские лучи, СТ). В некоторых вариантах осуществления техника визуализации представляет собой биолюминесцентное изображение. В определенных вариантах осуществления биолюминесцентное изображение включает анестезирование животного-хозяина, инъекцию биолюминесцентного соединения и последующее измерение фотонной эмиссии. В некоторых вариантах осуществления визуализацию опухоли достигают, используя любые способы, известные в области медицины.

Как описано более подробно в данном документе, в анализах для определения способности соединения (например, некоторого соединения) ингибировать рост клеток злокачественной опухоли определенные соединения могут проявлять значения $IC_{50} \leq 100$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 50$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 40$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 30$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 20$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 10$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 7,5$ мкМ. В определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 5$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 2,5$ мкМ. В определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 1$ мкМ. В определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 0,75$ мкМ. В определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 0,5$ мкМ. В определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 0,25$ мкМ. В определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 0,1$ мкМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 75$ нМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 50$ нМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 25$ нМ. В других определенных вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 10$ нМ. В других вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 7,5$ нМ. В других вариантах осуществления соединение проявляет значения $IC_{50} \leq 5$ нМ.

Фармацевтические композиции.

Некоторые аспекты настоящего изобретения включают применение фармацевтической композиции в любом из вышеуказанных способов, содержащей соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Фармацевтически приемлемые наполнители включают любой и все растворители, разбавители или другие жидкие среды, дисперсионные или суспензионные вспомогательные вещества, поверхностно-активные средства, изотонические средства, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связующие, смазочные средства и т.п., подходящие для конкретной желаемой лекарственной формы. Общие

принципы в составлении и/или производстве фармацевтических композиционных средств можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) и Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно получить любым способом, известным в области фармакологии. В основном такие способы получения включают этапы доставки активного ингредиента в соединении с носителем и/или одним или несколькими другими дополнительными ингредиентами и затем, если необходимо и/или желательно, формования и/или упаковки продукта в желаемую единичную или множественную дозированную форму.

Фармацевтические композиции можно получить, упаковать и/или продавать без упаковки в виде единичной дозы, и/или в виде нескольких единичных доз. Как используется в настоящем документе, "унифицированная доза" представляет собой отдельное количество фармацевтической композиции, содержащей заданное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, которую необходимо ввести субъекту, и/или целесообразной части такой дозировки, такой как, например, половина или одна треть такой дозировки.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого носителя и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции настоящего изобретения будут варьировать в зависимости от идентичности, размера и/или состояния субъекта, которого лечат, а также в зависимости от пути, которым композицию вводят. В качестве примера композиция может содержать от 0,1 до 100% (вес./вес.) активного ингредиента.

Фармацевтически приемлемые наполнители, используемые в производстве получаемых фармацевтических композиций, включают инертные разбавители, диспергирующие и/или гранулирующие средства, поверхностно-активные средства и/или эмульгаторы, средства, улучшающие распадаемость, связывающие средства, консерванты, буферные средства, смазывающие средства и/или масла. Наполнители, такие как какао-масло и суппозиторные воски, красящие вещества, покрывающие средства, подсластители, средства, придающие вкус и запах, также могут присутствовать в композиции.

Типичные разбавители включают карбонат кальция, карбонат натрия, кальция фосфат, дикальция фосфат, кальция сульфат, дикальций фосфат, натрия фосфат, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозит, хлорид натрия, сухой крахмал, кукурузный крахмал, порошкообразный сахар и др. и их комбинации.

Типичные гранулирующие и/или диспергирующие средства включают картофельный крахмал, кукурузный крахмал, крахмал тапиоки, натрия крахмалгликолят, глины, альгиновую кислоту, гуаровую камедь, цитрусовый жом, агар, бентонит, целлюлозу и древесные продукты, природное губчатое вещество, катиониты, кальция карбонат, силикаты, натрия карбонат, поперечносшитый поли(винилпирролидон) (кросповидон), натрия карбоксиметилкрахмал (натрия крахмалгликолят), карбоксиметилцеллюлозу, поперечносшитую натрия карбоксиметилцеллюлозу (кроскармеллоза), метилцеллюлозу, желатинизированный крахмал (крахмал 1500), микрокристаллический крахмал, водонерастворимый крахмал, кальция карбоксиметилцеллюлозу, силикат магнезия и алюминия (вигум), натрия лаурилсульфат, соединения четвертичного аммония и др. и их комбинации.

Типичные поверхностно-активные средства и/или эмульгаторы включают природные эмульгаторы (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, натрия альгинат, трагакант, хондрус, холестерин, ксантан, пектин, желатин, яичный желток, казеин, ланолин, холестерин, воск и лецитин), коллоидные глины (например, бентонит и вигум), производные длинноцепочечных аминокислот, высокомолекулярные спирты (например, стеариловый спирт, цетиловый спирт, олеиловый спирт, триацетин моностеарат, этиленгликоля дистеарат, глицерил моностеарат и пропиленгликоля моностеарат, поливиниловый спирт), карбомеры (например, карбоксиполиметил, полиакриловую кислоту, полимер акриловой кислоты и карбоксивиниловый полимер), каррагенан, целлюлозные производные (например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, порошкообразную целлюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу), сложные эфиры сорбитана и жирной кислоты (например, полиоксиэтилен сорбитан монолаурат, полиоксиэтилен сорбитан, полиоксиэтилен сорбитан моноолеат, сорбитан монопальмитат, сорбитан моностеарат, сорбитан тристеарат, глицерил моноолеат, сорбитан моноолеат), сложные эфиры полиоксиэтилена (например, полиоксиэтилена моностеарат, полиоксиэтилен-гидрогенизированное касторовое масло, полиэтоксифирированное касторовое масло, полиоксиметилен стеарат и солютон), сложные эфиры сахарозы и жирной кислоты, сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирной кислоты (например, кремофор), полиоксиэтилена эфиры (например, полиоксиэтилена лауриловый эфир), поли(винил-пирролидон), диэтиленгликоля монолаурат, триэтанолamina олеат, натрия олеат, калия олеат, этилолеат, олеиновую кислоту, этиллаурат, натрия лаурилсульфат, плуроник F 68, полуксамер 188, цетримония бромид, цетилпиридиния хлорид, бензалкония хлорид, доктуат натрия и др. и/или их комбинации.

Типичные связывающие средства включают крахмал (например, кукурузный крахмал и крахмальная паста), желатин, сахара (например, сахароза, глюкоза, декстроза, декстрин, меласса, лактоза, лактитол, маннит и др.), природные и синтетические камеди (например, гуммиарабик, натрия альгинат, экс-

тракт ирландского мха, камедь панвар, камедь гхатти, клейкое вещество лузги исапол, карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, ацетилцеллюлозу, поли(винилпирролидон), силикат магния и алюминия (вигум) и лиственнический арабиногалактан), альгинаты, полиэтиленоксид, полиэтиленгликоль, неорганические соли кальция, кремниевую кислоту, полиметакрилаты, воски, воду, спирт и др. и/или их комбинации.

Типичные консерванты включают антиоксиданты, хелатирующие средства, антимикробные консерванты, противогрибковые консерванты, спиртовые консерванты, кислотные консерванты и другие консерванты.

Типичные антиоксиданты включают альфа-токоферол, аскорбиновую кислоту, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, монотиоглицерин, калия метабисульфит, пропионовую кислоту, пропилгаллат, натрия аскорбат, натрия бисульфит, натрия метабисульфит и натрия сульфит.

Типичные хелатирующие средства включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и ее соли и гидраты (например, натрия эдетат, динатрия эдетат, тринатрия эдетат, кальция динатрия эдетат, дикалия эдетат и т.п.), лимонную кислоту и ее соли и гидраты (например, лимонной кислоты моногидрат), фумаровую кислоту и ее соли и гидраты, яблочную кислоту и ее соли и гидраты, фосфорную кислоту и ее соли и гидраты, и винную кислоту и ее соли и гидраты. Типичные антимикробные консерванты включают бензалкония хлорид, бензетония хлорид, бензиловый спирт, бронопол, цетримид, цетилпиридиния хлорид, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексетидин, имидамочевину, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, фенилртути нитрат, пропиленгликоль и тимеросал.

Типичные противогрибковые консерванты включают бутилпарабен, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бензойную кислоту, гидроксibenзойную кислоту, калия бензоат, калия сорбат, натрия бензоат, натрия пропионат и сорбиновую кислоту.

Типичные спиртовые консерванты включают этанол, полиэтиленгликоль, фенол, фенольные соединения, бисфенол, хлорбутанол, гидроксibenзоат и фенилэтиловый спирт.

Типичные кислотные консерванты включают витамин А, витамин С, витамин Е, бета-каротин, лимонную кислоту, уксусную кислоту, дигидроуксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, сорбиновую кислоту и фитиновую кислоту.

Другие консерванты включают токоферол, токоферола ацетат, детероксим мезилат, цетримид, бутилированный гидроксианизол (БНА), бутилированный гидрокситолуол (БНТ), этилендиамин, натрия лаурилсульфат (SLS), натрия лаурил эфир сульфат (SLES), натрия бисульфит, натрия метабисульфит, калия сульфит, калия метабисульфит, Glydant Plus, Phenonip, метилпарабен, Germall 115, Germaben II, Neolone, Kathon и Euxyl. В определенных вариантах осуществления консервант является антиоксидантом. В других вариантах осуществления консервант является хелатирующим средством.

Типичные буферные средства включают цитратные буферные растворы, ацетатные буферные растворы, фосфатные буферные растворы, аммония хлорид, калия карбонат, калия хлорид, кальция цитрат, кальция глюбионат, кальция глюцетат, кальция глюконат, D-глюконовую кислоту, кальция глицерофосфат, кальция лактат, пропановую кислоту, кальция леулинат, валериановую кислоту, дикальций ортофосфат, фосфорную кислоту, трикальцийфосфат, кальция гидроксида фосфат, калия ацетат, калия хлорид, калия глюконат, калийные смеси, дикалийфосфат, монокалийфосфат, калий-фосфатные смеси, натрия ацетат, натрия бикарбонат, хлорид натрия, натрия цитрат, натрия лактат, динатрийфосфат, моносодийфосфат, натрий-фосфатные смеси, трометамин, магния гидроксид, алюминия гидроксид, альгиновую кислоту, апиогенную воду, изотонический солевой раствор, раствор Рингера, этиловый спирт и др. и их комбинации.

Типичные смазывающие средства включают магния стеарат, кальция стеарат, стеариновую кислоту, диоксид кремния, тальк, солод, глицерилбеханат, гидрогенизированные растительные масла, полиэтиленгликоль, натрия бензоат, натрия ацетат, хлорид натрия, лейцин, магния лаурилсульфат, натрия лаурилсульфат и др. и их комбинации.

Типичные масла включают миндальное, из косточек абрикоса, плода авокадо, бабассу, бергамотное, семян черной смородины, огуречника, можжевельника, ромашки, канола, тмина, карнауба, касторовое, коричневое, какао-масло, кокосовое, рыбий жир, кофейное, кукурузное, из семян хлопчатника, эму, эвкалиптовое, энотеры, рыбий жир, из семян льна, гераниола, тыквенное, из виноградных косточек, из фундука, иссопа, изопропилмиристат, жожоба, свечного дерева, лавандиновое, лавандовое, лимонное, лица кубеба, ореха макадемия, мальвы, косточек манго, семян пенника лугового, норки, мускатного ореха, оливковое, апельсиновое, хоплостета, пальмовое, ядер кокосового ореха, косточек персика, арахисовое, маковое, семян тыквы, семян рапса, рисовых отрубей, розмариновое, сафлоровое, сандаловое, сансквы, пряное, облепиховое, кунжутное, масло ши, силиконовое, соевое, подсолнечное, чайного дерева, репейное, tsubaki, ветивера, грецкого ореха и масло пшеничных зародышей. Типичные масла включают, но не ограничиваясь, бутилстеарат, каприловый триглицерид, каприновый триглицерид, циклометикон, диэтилсебацат, диметикон 360, изопропилмиристат, минеральное масло, октилдодеканол, олеиловый

спирт, силиконовое масло и их комбинации.

Жидкие лекарственные формы для перорального и парентерального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (например, семян хлопчатника, арахиса, кукурузы, зародышей, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, сорбитана сложные эфиры полиэтиленгликолей и жирной кислоты и их смеси. Кроме инертных разбавителей пероральные композиции могут включать адъюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, средства, придающие вкус и запах. В определенных вариантах осуществления для парентерального введения конъюгаты настоящего изобретения смешивают с солюбилизующими средствами, такими как кремофор, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и их комбинации.

Инъецируемые препараты, например стерильные инъецируемые водные или маслосодержащие суспензии, можно составить согласно уровню техники, используя подходящие диспергирующие или смачивающие средства и суспендирующие средства. Стерильные инъецируемые препараты могут быть стерильным инъецируемым раствором, суспензией или эмульсией в нетоксическом парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых сред и растворителей, которые можно применять, находится вода, раствор Рингера, U.S.P. и изотонический раствор хлорида натрия. К тому же, стерильные жирные масла обычно используют как растворитель или питательную взвесь. Для этой цели можно использовать любое легкое жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. К тому же, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, применяют в приготовлении инъекций.

Составы инъекций можно стерилизовать, например, фильтрацией через удерживающий бактерии фильтр или внедрением стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворить или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъецируемой среде перед применением.

С целью продлить эффект лекарственного средства обычно желательна медленная абсорбция лекарственного средства из подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно выполнять применением жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства, таким образом, зависит от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно, замедленная абсорбция парентерально вводимой формы лекарственного средства выполняется путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляной среде.

Композиции для ректального или влагалищного введения представляют собой типично суппозитории, которые можно получить смешиванием конъюгатов настоящего изобретения с подходящими нераздражающими наполнителями или носителями, такими как какао-масло, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела и, следовательно, тают в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождают активный ингредиент.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активный ингредиент смешан по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым наполнителем или носителем, таким как натрия цитрат или дикальция фосфат и/или а) заполнителями или разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик, в) увлажнителями, такими как глицерин, д) средствами, улучшающими распадаемость, такими как агар, кальция карбонат, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и натрия карбонат, е) задерживающими раствор средствами, такими как парафин, ф) ускорителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония, г) смачивающими средствами, такими как, например, цетиловый спирт и глицерина моностеарат, h) абсорбентами, такими как каолиновая и бентонитовая глина, и i) смазочными средствами, такими как тальк, кальция стеарат, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, натрия лаурилсульфат, и их смесями. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма может содержать буферные средства.

Твердые композиции подобного типа можно применять в качестве заполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах, используя такие наполнители, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получить с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтических составов. Они могут, необязательно, содержать замутняющие средства и могут быть композицией, при которой они

высвобождают только активный ингредиент(ы) или предпочтительно в конкретном отделе кишечника, необязательно, замедленным образом. Примеры капсулирующих композиций, которые могут использоваться, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции подобного типа можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах, используя такие наполнители, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Активные ингредиенты могут быть в микроинкапсулированной форме с одним или несколькими наполнителями, как указано выше. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получить с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия, покрытия контролируемого высвобождения и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтических составов. В таких твердых лекарственных формах активный ингредиент может быть примешан по меньшей мере к одному инертному разбавителю, такому как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы могут содержать, что является обычной практикой, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например смазочные средства для таблетирования и другие вспомогательные вещества для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы могут содержать буферные средства. Они могут, необязательно, содержать замутняющие средства и могут быть композицией, при которой они высвобождают только активный ингредиент(ы) или предпочтительно в конкретном отделе кишечника, необязательно, замедленным образом. Примеры капсулирующих композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

Лекарственные формы для местного и/или трансдермального введения соединения данного изобретения могут включать мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, средства для ингаляции и/или пластыри. В общем, активный ингредиент примешивают в стерильных условиях к фармацевтически приемлемому носителю, и/или любым требуемым консервантам, и/или буферам, что могут потребоваться. Дополнительно, настоящее изобретение предполагает применение трансдермальных пластырей, которые обычно имеют дополнительным преимуществом обеспечение контролируемой доставки активного ингредиента в тело. Такие лекарственные формы можно получить, например, растворением и/или распределением активного ингредиента в подходящей среде. Альтернативно или дополнительно, скорость можно контролировать или обеспечением контролирующей скорости мембраны и/или диспергированием активного ингредиента в полимерную матрицу и/или гель.

Подходящие устройства для применения в доставке интрадермальных фармацевтических композиций, описанные в данном документе, включают устройства с короткими иглками, такие как описанные в патентах США № 4886499; 5190521; 5328483; 5527288; 4270537; 5015235; 5141496 и 5417662. Интрадермальные композиции можно вводить устройствами, которые ограничивают эффективную глубину проникновения иглы в кожу, такими как описанные в публикации международной заявки WO 99/34850 и их функциональными эквивалентами. Устройства безыгольного впрыскивания, которые доставляют жидкие вакцины к дерме посредством жидкостного безыгольного инъектора и/или посредством иглы, которая прокалывает роговой слой и производит впрыск, который достигает дермы, являются подходящими. Устройства безыгольного впрыскивания описаны, например, в патентах США № 5480381; 5599302; 5334144; 5993412; 5649912; 5569189; 5704911; 5383851; 5893397; 5466220; 5339163; 5312335; 5503627; 5064413; 5520639; 4596556; 4790824; 4941880; 4940460 и публикациях международных заявок WO 97/37705 и WO 97/13537. Устройства для баллистической доставки порошка/частиц, которые используют сжатый газ для разгонки вакцины в порошкообразной форме через внешние слои кожи к дерме, являются подходящими. Альтернативно или дополнительно, обычные шприцы можно использовать в типичном способе манту интрадермального введения.

Составы, подходящие для местного введения, включают, но не ограничиваясь, жидкие и/или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, эмульсии масло-в-воде и/или вода-в-масле, такие как кремы, мази и/или пасты, и/или растворы, и/или суспензии. Вводимые местно составы могут, например, содержать приблизительно от 1 до приблизительно 10% (вес./вес.) активного ингредиента, хотя концентрация активного ингредиента может быть настолько большой, как предел растворимости активного ингредиента в растворителе. Составы для местного введения могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе.

Фармацевтическую композицию данного изобретения можно получить, упаковать и/или продать в составе, подходящем для пульмонального введения через ротовую полость. Такой состав может содержать сухие частицы, которые содержат активный ингредиент и которые имеют диаметр в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 7 нм или от приблизительно 1 до приблизительно 6 нм. Такие композиции удобны в форме сухих порошков для введения, используя устройство, содержащее емкость для сухого порошка, в которую поток газа-вытеснителя можно направить для диспергирования порошка, и/или используя контейнер с самовытесняющимся раствором/распыляющимся порошком, такое как устройство, содержащее активный ингредиент, растворенный и/или суспендированный в кипящем при низкой температуре газе-вытеснителе, в запаянном контейнере. Такие порошки содержат частицы, где по меньшей мере 98% частиц по весу имеют диаметр больше чем 0,5 нм и по меньшей мере 95% частиц по количеству имеют диаметр менее чем 7 нм. Альтернативно, по меньшей мере 95% частиц по весу имеют

диаметр больше чем 1 нм и по меньшей мере 90% частиц по количеству имеют диаметр менее чем 6 нм. Композиции сухого порошка могут включать твердый мелкодисперсный порошкообразный разбавитель, такой как сахар, и удобно обеспечиваются в форме унифицированной дозы.

Кипящие при низких температурах газы-вытеснители обычно включают жидкие газы-вытеснители с точкой кипения ниже 65°F при атмосферном давлении. Обычно газ-вытеснитель может составлять 50-99,9% (вес./вес.) композиции, и активный ингредиент может составлять 0,1-20% (вес./вес.) композиции. Газ-вытеснитель может дополнительно содержать дополнительные ингредиенты, такие как жидкое неионное и/или твердое анионное поверхностно-активное вещество и/или твердый разбавитель (который может иметь размер частиц такого же порядка, что и частицы, содержащие активный ингредиент).

Фармацевтические композиции настоящего изобретения, составленные для пульмональной доставки, могут обеспечивать активный ингредиент в форме капель раствора и/или суспензии. Такие составы можно получить, упаковать и/или продать в виде водного и/или разбавленного спиртового растворов и/или суспензий, необязательно стерильных, содержащих активный ингредиент, и можно удобно вводить, используя любое устройство для распыления и/или разбрызгивания. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая без ограничения ароматизирующее средство, такое как сахарин натрия, эфирное масло, буферное средство, поверхностно-активное средство и/или консервант, такой как метилгидроксibenзоат. Капли, обеспеченные этим путем введения, могут иметь средний диаметр в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 200 нм.

Составы, описанные в данном документе как пригодные для пульмональной доставки, пригодны для интраназальной доставки фармацевтической композиции настоящего изобретения. Другой состав, подходящий для интраназального введения, представляет собой крупнодисперсный порошок, содержащий активный ингредиент и имеющий средние частицы от приблизительно 0,2 до 500 мкм. Такой состав вводят быстрой ингаляцией через носовой канал из контейнера для порошка, который держат близко к ноздрям.

Составы, подходящие для назального введения, могут, например, содержать от приблизительно по меньшей мере 0,1% (вес./вес.) и вплоть до 100% (вес./вес.) активного ингредиента и могут содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. Фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно получить, упаковать и/или продать в составе, подходящем для буккального введения. Такие составы могут быть, например, в форме таблеток и/или пастилок, полученных с использованием общепринятых способов, и могут содержать, например, 0,1-20% (вес./вес.) активного ингредиента, причем баланс содержит перорально растворимую и/или распадающуюся композицию и, необязательно, один или несколько дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. Альтернативно, составы, подходящие для буккального введения, могут содержать порошок и/или раствор в аэрозольном состоянии и/или в распыленном состоянии и/или суспензию, содержащую активный ингредиент. Такие порошкообразные в аэрозольном состоянии и/или аэрозольном состоянии составы при диспергировании могут иметь средний размер частиц и/или капель в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 200 нм и могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе.

Фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно получить, упаковать и/или продать в составе, подходящем для офтальмического введения. Такие составы могут быть, например, в форме глазных капель, включая, например, 0,1/1,0% (вес./вес.) раствор и/или суспензию активного ингредиента в водном или маслянистом жидком носителе. Такие капли могут дополнительно содержать буферные средства, соли и/или один или несколько других дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. Другие офтальмически вводимые составы, которые являются пригодными, включают такие, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме и/или в липосомальном препарате. Ушные капли и/или глазные капли предполагаются в объеме настоящего изобретения.

Хотя описания фармацевтических композиций, обеспеченные в данном документе, принципиально направлены на фармацевтические композиции, которые подходят для введения людям, специалисту будет понятно, что такие композиции обычно подходят для введения животным всех разновидностей. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, с целью превратить в композиции, подходящие для введения различным животным, хорошо изучена, и, как правило, квалифицированный ветеринарный фармаколог может разработать и/или выполнить такую модификацию обычным экспериментированием. Общие принципы составления и/или производства фармацевтических композиций можно обнаружить, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Обеспеченные соединения можно вводить, используя любое количество и любой путь введения, эффективный для лечения. Точное требуемое количество будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести инфекции, конкретной композиции, ее вида введения, ее вида активности и т.п.

Соединения, обеспеченные в данном документе, типично составлены в форме единичной дозировки для удобства введения и постоянства дозировки. Будет понятно, однако, что общее дневное применение композиций настоящего изобретения будет определено лечащим врачом в объеме озвученного медицин-

ского решения. Конкретный уровень терапевтически эффективной дозы для любого конкретного субъекта или организма будет зависеть от разных факторов, включая заболевание, нарушение или состояние, которое лечат, и тяжести нарушения; активности конкретного применяемого активного ингредиента; конкретной применяемой композиции; возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола и рациона субъекта; время введения, пути введения и скорости выведения конкретного применяемого активного ингредиента; длительности лечения; применяемых лекарственных средств в комбинации или совместно с конкретным применяемым активным ингредиентом; и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Соединения и композиции, обеспеченные в данном документе, можно вводить любым путем, включая пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интракостальный, подкожный, внутрижелудочковый, трансдермальный, внутрикожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), через слизистую, назальный, буккальный, энтеральный, сублингвальный; путем интратрахеального вливания, бронхиального вливания и/или ингаляции; и/или в виде перорального спрея, назального спрея и/или аэрозоля. В частности, предполагаемыми путями являются систематические внутривенные инъекции, местное введение через кровеносную и/или лимфатическую систему и/или непосредственное введение в поврежденное место, в болюсном режиме или режиме непрерывной инфузии. В основном наиболее подходящий путь введения будет зависеть от разных факторов, включая природу средства (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта), состояние субъекта (например, является ли субъект способным переносить пероральное введение) и пр.

Точное количество соединения, требуемое для достижения терапевтически эффективного количества, будет варьировать от субъекта к субъекту, зависеть от, например, вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести побочных эффектов или нарушения, особенности конкретного соединения(й), режима введения и т.п. Желаемую дозировку можно давать три раза в день, два раза в день, раз в день, через день, раз в три дня, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления желаемую дозировку можно давать, используя множественные введения (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более введений).

В определенных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения для введения один или несколько раз в день 70 кг взрослому человеку может содержать от приблизительно 0,0001 до приблизительно 3000 мг, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 0,001 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 или от приблизительно 100 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 40 мг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 30 мг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг и от приблизительно 1 до приблизительно 25 мг соединения на 1 кг. Будет оценено, что диапазон доз, описанный в данном документе, обеспечивает руководство для введения обеспеченных фармацевтических композиций взрослым. Количество, которое необходимо ввести, например, ребенку или подростку, может быть определено врачом или специалистом в данной области техники и может быть ниже или такое же, как вводится взрослому. Желаемую дозировку можно давать трижды в день, дважды в день, раз в день, через день, раз в три дня, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления желаемую дозировку можно давать, используя многократное введение (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более введений).

Способ включает введение соединения в терапевтически эффективной дозе субъекту-хозяину. В некоторых вариантах осуществления субъектом является животное. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза содержит количество от приблизительно 0,1 до приблизительно 50,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза содержит количество от приблизительно 0,5 до приблизительно 50,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза содержит количество от приблизительно 0,5 до приблизительно 40,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза содержит количество от приблизительно 0,5 до приблизительно 30,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза содержит количество в диапазоне от приблизительно 1,0 до приблизительно 25,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза содержит количество от приблизительно 1,5 до приблизительно 15,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления лечение вводят локально. В некоторых вариантах осуществления лечение вводят непрерывной инфузией в течение некоторого периода времени. В определенных вариантах осуществления введение проводят посредством внутриартериальной инфузии. В определенных вариантах осуществления введение проводят посредством внутриартериальной инфузии через артерию, питающую опухоль, которую лечат.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно включают введение по меньшей мере одной другой терапии или терапевтических средств. Соединение или композицию

можно ввести одновременно с, перед или после другой терапии или терапевтических средств. В общем, каждая терапия или средство будут вводиться в дозе и/или по графику, определенному для этого средства. Далее будет определено, что дополнительное терапевтически активное средство, используемое в этой комбинации, можно вводить вместе в одной композиции или отдельно в различных композициях. Конкретная комбинация для использования в режиме будет взята с учетом совместимости соединения с терапией или терапевтическим средством и/или желаемого терапевтического эффекта, который необходимо достичь. В основном ожидают, что дополнительная терапия или терапевтическое средство, используемое в комбинации, будет использовано с уровнями, которые не превышают уровни, с которыми они применяются отдельно. В некоторых вариантах осуществления используемые уровни в комбинации будут ниже, чем таковые, используемые отдельно.

Соединения или композиции можно вводить в комбинации с терапией или терапевтическим средством, которое улучшает их биодоступность, снижает и/или модифицирует их метаболизм, ингибирует их выведение и/или модифицирует их распределение в теле. Также будет оценено, что используемая терапия или терапевтическое средство могут достигать желаемого эффекта для подобного заболевания или нарушения, и/или они могут достигать различных эффектов (например, контроль неблагоприятных побочных эффектов).

Терапии злокачественных опухолей включают, но не ограничиваясь, хирургию и оперативное лечение, лучевую терапию и терапевтические средства (например, биотерапевтические средства и химиотерапевтические вещества). В определенных вариантах осуществления способ включает применение облучения.

Типичные биотерапевтические средства включают, но не ограничиваясь, интерфероны, цитокины (например, фактор некроза опухолей, интерферон α , интерферон γ), вакцины, гематопозитические факторы роста, серотерапию при помощи моноклональных антител, иммуностимуляторы и/или иммуномодулирующие средства (например, IL-1, 2, 4, 6 или 12), факторы роста иммунных клеток (например, GM-CSF) и антитела (например, HERCEPTIN (трастузумаб), T-DM1, AVASTIN (бевацизумаб), ERBITUX (цетуксимаб), VECTIBIX (панитумумаб), RITUXAN (ритуксимаб), BEXXAR (тоситумомаб)).

Типичные химиотерапевтические средства включают, но не ограничиваясь, антиэстрогены (например, тамоксифен, ралоксифен и мегестрол), агонисты LHRH (например, гозерелин и лейпролид), антиандрогены (например, флутамид и бикалутамид), фотодинамические терапии (например, вертепорфин (BPD-MA), фталоцианин, фотосенсибилизатор Pc4 и демеетокси-гипокреллин А (2BA-2-DMHA)), азотистые иприты (например, циклофосфамид, ифосфамид, трофосфамид, хлорамбуцил, эстрамустин и мелфалан), нитрозомочевины (например, кармустин (BCNU) и ломустин (CCNU)), алкилсульфонаты (например, бусульфан и треосульфат), триазены (например, дакарбазин, темозоломид), платиносодержащие соединения (например, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин), алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин), таксоиды (например, паклитаксел или эквивалент паклитаксела, такой как связанный с альбумином паклитаксел в форме наночастиц (ABRAXANE), связанный с докозагексаеновой кислотой паклитаксел (DHA-паклитаксел, таксопрексин), связанный с полиглутаматом паклитаксел (PG-паклитаксел, паклитаксел полиглукс, ST-2103, XYOTAX), активирующее опухоль пролекарство (TAP) ANG1005 (Angiофер-2 связанный с тремя молекулами паклитаксела), паклитаксел-EC-1 (паклитаксел связанный с erbB2-распознающим пептидом EC-1) и сопряженный с глюкозой паклитаксел, например, 2'-паклитаксел метил 2-глюкопиранозилсукцинат; доцетаксел, таксол), эпиподофиллины (например, этопозид, этопозид фосфат, тенипозид, топотекан, 9-аминокамптотецин, камптоиринотекан, иринотекан, кризнатол, митомицин C), антиметаболиты, ингибиторы DHFR (например, метотрексат, дихлорметотрексат, триметрексат, эдатрексат), ингибиторы IMP дегидрогеназы (например, микофеноловая кислота, тиазофуридин, рибавирин и EICAR), ингибиторы рибонуклеотидредуктазы (например, гидроксимочевина и дефероксамин), аналоги урацила (например, 5-фторурацил (5-FU), флоксуридин, доксифлуридин, ралтитрексед, тегафур-урацил, капецитабин), аналоги цитозина (например, цитарабин (ара C), цитозин арабанозид и флударабин), аналоги пурина (например, меркаптопурин и тиогуанин), аналоги витамина D3 (например, EB 1089, CB 1093 и KH 1060), ингибиторы изопренилирования (например, ловастатин), допаминовые нейротоксины (например, ион 1-метил-4-фенилпиридиния), ингибиторы клеточного цикла (например, стауроспорин), актиномицин (например, актиномицин D, дактиномицин), блеомицин (например, блеомицин A2, блеомицин B2, пеплеомицин), антрациклин (например, даунорубин, доксорубин, пэгилированный липосомный доксорубин, идарубин, эпирубин, пирарубин, зорубин, митоксантрон), ингибиторы MDR (например, верапамил), ингибиторы Ca^{2+} АТФазы (например, тапсигаргин), иматиниб, талидомид, леналидомид, ингибиторы тирозинкиназы (например, акситиниб (AGO 13736), бозутиниб (SKI-606), цедираниб (RECENTIN™, AZD2171), дазатиниб (SPRYCEL®, BMS-3 54825), эрлотиниб (TARCEVA®), гефитиниб (IRESSA®), иматиниб (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), лапатиниб (TYKERB®, TYVERB®), лестауртиниб (CEP-701), нератиниб (HKI-272), нилотиниб (TASIGNA®), семаксаниб (семаксаниб, SU5416), сунитиниб (SUTENT®, SU11248), тоцераниб (PALLADIA®), вандетаниб (ZACTIMA®, ZD6474), ваталаниб (PTK787, PTK/ZK), трастузумаб (HERCEPTIN®), бевацизумаб (AVASTIN®), ритуксимаб (RITUXAN®),

цетуксимаб (ERBITUX®), панитумумаб (VECTIBIX®), ранибизумаб (Lucentis®), нилотиниб (TASIGNA®), сорафениб (NEXAVA®), эверолимус (AFINITO®), алемтузумаб (CAMPATH®), гемтузумаб озогамицин (MYLOTARG®), темсиролимус (TORISEL®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, довитииниб лактат (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, тивозаниб (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647 и/или XL228), ингибиторы протеасомы (например, бортезомиб (VELCADE)), ингибиторы mTOR (например, рапамицин, темсиролимус (CCI-779), эверолимус (RAD-001), ридафоролимус, AP23573 (Ariad), AZD8055 (AstraZeneca), BEZ235 (Novartis), BGT226 (Novartis), XL765 (Sanofi Aventis), PF-4691502 (Pfizer), GDC0980 (Gentech), SF1126 (Semafoe) и OSI-027 (OSI)), облимерсен, гемцитабин, карминомицин, лейковорин, пеметрексед, циклофосфамид, дакарбазин, прокарбизин, преднизолон, дексаметазон, кампатецин, пликамицин, аспарагиназу, аминокптерин, метоптерин, порфирамицин, мелфалан, лейрозицин, лейрозин, хлорамбуцил, трабектедин, прокарбазин, дискодермолит, карминомицин, аминокптерин и гексаметил мел амин.

Наборы.

В еще одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает наборы (например, фармацевтические упаковки) для лечения пролиферативного нарушения, содержащие соединение формулы (A) или (B) и инструкции по введению субъекту для лечения пролиферативного нарушения. Наборы могут содержать обеспеченную композицию и контейнер (например, флакон, ампулу, бутылочку, шприц и/или распылитель или другой подходящий контейнер). В некоторых вариантах осуществления обеспеченные наборы могут необязательно дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий водный носитель для разбавления, или суспензию обеспеченной композиции для подготовки введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления содержимое обеспеченных контейнера с составом и контейнера с растворителем комбинируют для формирования по меньшей мере одной единичной лекарственной формы.

Необязательно, один контейнер может содержать один или несколько отделений для содержания обеспеченной композиции и/или подходящего водного носителя для суспензии или разбавления. В некоторых вариантах осуществления один контейнер может подходить для модификации таким образом, что контейнер допускает физическую модификацию, позволяя, таким образом, комбинирование ячеек и/или компонентов отдельных ячеек. Например, пакет из фольги или пластиковый пакет может содержать две или более ячейки, отделенные перефорированной запайкой, которую можно поломать так, чтобы скомбинировать содержимое двух отдельных ячеек как только сгенерирован сигнал о разрыве запайки. Фармацевтическая упаковка или набор могут, таким образом, содержать такие контейнеры с несколькими ячейками, содержащие обеспеченную композицию и подходящий растворитель и/или подходящий водный носитель для суспензии.

Необязательно, инструкции по применению дополнительно обеспечивают в таких наборах данного изобретения. Такие инструкции могут обеспечивать, в общем, например, инструкции по дозировке и введению. В других вариантах осуществления инструкции могут также обеспечивать дополнительные детали, относящиеся к особым инструкциям для конкретных контейнеров и/или систем введения. Более того, инструкции могут обеспечивать особые инструкции для применения в сопряжении и/или в комбинации с дополнительной терапией.

Примеры

С тем чтобы настоящее изобретение, описанное в данном документе, могло быть понято более полно, изложены следующие примеры. Следует понимать, что эти примеры присутствуют только для иллюстративных целей и не должны толковаться как ограничивающие это изобретение каким бы то ни было образом.

Пример 1. Ингибирование образцов от первичных пациентов.

Табл. 1 освещает ряд образцов от первичных пациентов с лейкозом: как с острым, так и хроническим и как не получавших лечения, так и невосприимчивых к лечению и эффект гранатицина А, гранатицина В, производного 1 и производного 2 в отношении ингибирования клеточной пролиферации. Данные IC₅₀ выявляют, что гранатицин В является приблизительно на порядок более активным, нежели гранатицин А, в отношении всех исследуемых образцов и ингибирует клеточную пролиферацию в низком наномолярном диапазоне концентраций. Два помеченных звездочкой образца представляют последовательные образцы, взятые у одних и тех же пациентов после того, как они получили 2-3 цикла дополнительной высокодозовой резервной химиотерапии, и показывают, что, несмотря на невосприимчивость к резервной химиотерапии, путь, опосредованный Cdc7, остается потенциально эффективной целью, поскольку чувствительность к этим соединениям остается неизменной. Важно, каждый образец от пациента был устойчив к предварительной полученной терапии с помощью данного анализа.

Таблица 1

Ингибирование образцов от пациентов с лейкозом

Образец лейкоза	IC ₅₀ (мкмоль)			
	Гранатицин А	Производ. 1	Производ. 2	Гранатицин В
AML, de novo	0,72	0,62	2,01	0,18
AML, первичный, рефрактерный 1	0,75	0,62	1,55	0,11
AML, первичный, рефрактерный 1 *	0,63	0,47	1,44	0,10
AML, первичный, рефрактерный	0,77	0,84	1,45	0,14
AML, рецидивирующий	1,20	0,70	2,23	0,10
AML, рецидивирующий	0,21	0,23	0,35	0,05
AML, рецидивная s/p HSCT	1,88	1,86	8,10	0,62
AMMoL	0,99	0,79	5,88	0,49
ALL, Ph+	0,56	0,47	2,57	0,19
Бифенотипический острый лейкоз 1	0,30	0,69	0,90	0,04
Бифенотипический острый лейкоз 1 *	0,54	0,76	1,02	0,10
CML, без лечения	0,26	0,33	1,24	0,08
CLL, без лечения, делеция в хромосоме 17p.	0,46	0,36	1,21	0,31
PhALL3.1	0,14	0,12	0,47	0,03

* Показывает второй образец от одного и того же пациента после высокодозовой химиотерапии.

Табл. 2 освещает клеточные линии и образцы от первичных пациентов, исследуемые в отношении ингибирования клеточной пролиферации гранатицином А и гранатицином В (обобщенно из фиг. 16А и 16В).

Таблица 2

Клеточная линия	Описание	IC ₅₀ (микромоляр)	
		Гранатицин А	Гранатицин В
ALL3	Гемопозитические клетки острого лимфобластного лейкоза; положительная по филадельфийской хромосоме	0,14	0,03
HL60	Гемопозитические клетки острого промиелоцитарного лейкоза человека	0,14	0,09
HL60 MX1	Гемопозитические клетки острого промиелоцитарного лейкоза человека; MDR вариант HL60, подвергнутый селекции с митоксантроном-клон 1	0,17	0,08
HL60 MX2	Гемопозитические клетки острого промиелоцитарного лейкоза человека; MDR вариант HL60, подвергнутый селекции с митоксантроном-клон 2	0,11	0,07

HL60 RV	Гемопозитические клетки острого промиелоцитарного лейкоза человека: MDR вариант HL60, подвергнутый селекции с винкристином	0,09	0,07
JEKO	Гемопозитические клетки лимфомы из клеток мантийной зоны человека	0,04	0,02
JURKAT E61	Гемопозитические клетки острого лимфобластического Т-клеточного лейкоза человека	0,05	0,02
K562	Гемопозитические клетки хронического миелоидного лейкоза человека, превращающегося в острый эритролейкоз	0,12	0,08
KASUMI4	Гемопозитические клетки хронического миелоидного лейкоза человека, превращающегося в острый эритролейкоз-сверхэкспрессия EVI1	0,30	0,18
MEG01	Гемопозитические клетки хронического миелоидного лейкоза человека, превращающегося в острый мегакариобластный лейкоз	0,17	0,08
MOLT3	Гемопозитические клетки острого лимфобластного Т-клеточного лейкоза человека	0,03	0,01
NCEB1	Гемопозитические клетки лимфомы из клеток мантийной зоны человека	0,33	0,26
132	Образец от первичного пациента с хроническим лимфолейкозом	0,13	0,01
ALBU	Образец от первичного пациента с эссенциальной тромбоцитопенией, превращающейся в острый миелоидный лейкоз, невосприимчивый к лечению	0,43	0,03

DOGO	Образец от первичного пациента с хроническим лимфолейкозом с трисомией по 12 хромосоме и немутировавшим локусом тяжелой цепи Ig	0,15	0,07
GLHU	Образец от первичного пациента с хроническим миелоидным лейкозом	0,26	0,08
JABR	Образец от первичного пациента с рецидивирующим/невосприимчивым к лечению острым миелоидным лейкозом с нормальной цитогенетикой и Flt-3 ITD	0,21	0,05
JAKL	Образец от первичного пациента с хроническим лимфолейкозом с трисомией по 12 хромосоме и немутировавшим локусом тяжелой цепи Ig	0,05	0,01
JAMC	Образец от первичного пациента с острым миелоидным лейкозом с инверсией в 16 хромосоме	0,06	0,04
JAQU	Образец от первичного пациента с рецидивирующим/невосприимчивым к лечению пре-B-клеточным острым лимфобластным лейкозом	0,05	0,01
JOBL	Образец от первичного пациента с рецидивирующим/рефрактерным острым миелоидным лейкозом	0,56	0,19
JOHO	Образец от первичного пациента с первичным рефрактерным острым миелоидным лейкозом с inv3 и моносомией по 7 (невосприимчивый к лечению аллогенной ВМТ)	0,88	0,17

JOQU	Образец от первичного пациента с рецидивирующим/рефрактерным острым миелоидным лейкозом с трисомией по хромосоме №8 и Нt-3 ITD	0,77	0,14
JUCO	Образец от первичного пациента с пре-B-клеточным острым лимфобластным лейкозом с t(4;11), включающим ген MLL	0,08	0,01
MAWI	Образец от первичного пациента с рецидивирующим/рефрактерным острым миелоидным лейкозом с нормальной цитогенетикой	0,72	0,18
MAWIB	Образец от первичного пациента с вторичным хроническим миелоидным лейкозом	0,42	0,16
MIHA	Образец от первичного пациента с рецидивирующим/рефрактерным острым бифенотипическим лейкозом (пациент был невосприимчив к лечению трансплантацией костного мозга)	0,30	0,04
PAPR	Образец от первичного пациента с рецидивным острым миеломоноцитарным лейкозом	0,99	0,49
RADO	Образец от первичного пациента с первичным рефрактерным острым миелоидным лейкозом с множественными хромосомными аномалиями (-5,-7)	0,06	0,03
RORI	Образец от первичного пациента с рецидивным/рефрактерным острым миелоидным лейкозом с трисомией по хромосоме №8	1,20	0,10

SOPA	Образец от первичного пациента с вторичной острым миелоидным лейкозом с хромосомной аномалией 11q23	0,10	0,09
STGL	Образец от первичного пациента с рефрактерным острым миелоидным лейкозом с множественными хромосомными аномалиями (невосприимчивый к лечению аллогенной BMT)	1,88	0,62
A2780	Солидная карцинома яичника человека	0,12	0,02
A549	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация G12S KRAS	0,28	0,09
BE(2)C	Солидная нейробластома человека, мутант p53	0,07	0,04
CWR22	Солидная аденокарцинома предстательной железы человека	0,09	0,04
FUUR1	Солидная гипернефрома человека с реципрокным слитым транскриптом ASPL-TFE3	0,48	0,34
H11-18	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация L858R EGFR	0,42	0,06
H1 650	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация DelE746-A750 EGFR; RAS дикого типа, PTEN-нулевая	0,29	0,06
H1734	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация G13C KRAS	0,24	0,04
H1 975	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация T790M/L858R EGFR; мутация R273H p53; PTEN-нулевая; KRAS дикого типа	0,12	0,03

H2030	Солидная аденокарцинома легкого человека; EGFR дикого типа; мутация G12C KRAS; мутация G262V P53; PTEN-нулевая	0,49	0,22
H2122	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация G12C KRAS; мутации Q16L и C176F P53	1,19	0,21
H23	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация G12c KRAS; мутация M246I P53	0,12	0,05
H2444	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация G12V KRAS	0,31	0,03
H3255	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация L858R EGFR; KRAS дикого типа; P53 дикого типа	0,21	0,07
H358	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация G13C KRAS	0,21	0,05
H460	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация Q61H KRAS	0,39	0,08
H820	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутации Del E746-E749 и T790M EGFR	0,09	0,05
HCC4011	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация L858R EGFR; KRAS дикого типа	0,14	0,05
HCC827	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация DelE746-A750 EGFR	0,28	0,12
HELA N10	Солидная аденокарцинома шейки матки человека (положительные по инфекции папилломавирусом человека)	1,27	0,97

HPLD1	Плотные иммортализованные клетки эпителия бронхиол человека с большим Т антигеном SV-40	0,18	0,04
HTB 15	Солидная глиобластома человека (U-118MG), классифицируемая как IV стадия	0,65	0,46
JNDSRCT1	Клеточная линия солидной десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли	0,07	0,05
MCF-10A	Плотный нормальный эпителий молочной железы человека	0,26	0,24
MCF-7	Солидный инвазивный внутрипротоковый рак молочной железы, положительная по эстрогеновому и прогестероновому рецептору	0,17	0,13
MDA-MB-231	Солидная метастазирующая аденокарцинома молочной железы человека; отрицательная по эстрогеновому, прогестероновому рецептору и рецептору HER2/NEU	0,47	0,29
MESO47	Солидная мезотелиома человека, сверхэкспрессия WT-1	0,61	0,38
OVCAR3	Солидная аденокарцинома яичника человека	0,21	0,11
PC9	Солидная аденокарцинома легкого человека; мутация DelE746-A750 EGFR	0,30	0,07
RB355	Солидная ретинобластома человека	0,09	0,04
RH30	Солидная рабдомиосаркома человека; мутация P53	0,13	0,08
SKMEL28	Солидная меланома человека	0,54	0,34
SKOV3	Солидная аденокарцинома человека из яичника, полученная из асцитов, гиподиплоид	0,12	0,04
SW1736	Солидная анапластическая карцинома щитовидной железы человека с мутацией BRAF V600E	0,16	0,02
TC71	Солидная саркома Юинга человека	0,15	0,09
Y79	Солидная ретинобластома человека	0,06	0,05

Пример 3. Исследования стабильности с использованием гранатицина А.

Стандартные исследования стабильности в микросомах печени проводили с микросомами мыши и человека с гранатицином А и было показано, что это лекарственное средство быстро выводится печенью. Определяли стабильность гранатицина А в микросомах печени мыши и человека. В микросомах печени мыши утилизация в момент времени 30 мин составляла 3,68%. В микросомах печени мыши утилизация в момент времени 60 мин составляла 3,84%. В микросомах печени человека утилизация в момент времени 30 мин составляла 23,89%. В микросомах печени человека утилизация в момент времени 60 мин составляла 12,01%.

Пример 4. Предварительный скрининг гранатицина В.

Стандартные исследования растворимости выполняли с гранатицином В. В водном растворе гранатицин В является растворимым в концентрации 4,0 мг/мл. В спирте гранатицин В является растворимым в концентрации >188 мг/мл. В метаноле гранатицин В является растворимым в концентрации >252 мг/мл.

Различные составы гранатицина В также исследовали и измеряли данные РК (см. табл. 3).

Таблица 3

Предварительный скрининг РК мыши

Гранатин В, скрининг РК мыши мг/кг	AUC _{inf} (площадь под фармакокинетической кривой) (час-мкг/мл)	Период полувыведения (t _{1/2} ^β)	C _{max} (мкг/мл)	CL (мл/час/кг)
A: 1,25% этанол и Tween-20	3532,5	6,9	2834,7	1415,4
B: 0,6%GDO-12	477981,5	3445,5	2537,2	10,5
C: 5%GDP-12	2689,9	6,6	2449,9	1858,8
D: DMSO	2724,5	2,1	2210,9	1835,2

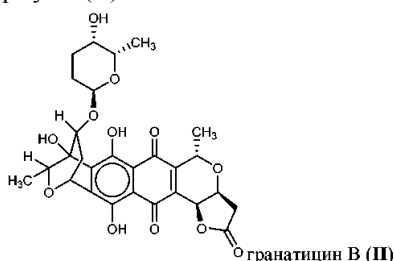
Другие варианты осуществления

Все патенты, патентные заявки и ссылки на литературу, цитируемые в данном документе, являются включенными в данный документ с помощью ссылки.

Выше было изложено описание определенных неограничивающих вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут, что различные изменения и модификации в отношении описания могут быть осуществлены без отступления от сущности или объема настоящего изобретения, которые определены в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

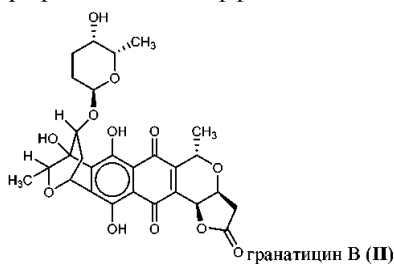
1. Применение соединения формулы (II)



или его фармацевтически приемлемой соли,

для лечения или предотвращения рака у человека, где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы, меланому, острый миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или острый бифенотипический лейкоз.

2. Способ лечения или предотвращения рака у человека, нуждающегося в этом, предусматривающий введение терапевтически или профилактически эффективного количества соединения формулы (II)



или его фармацевтически приемлемой соли,

где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы, меланому, острый миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или острый бифенотипический лейкоз.

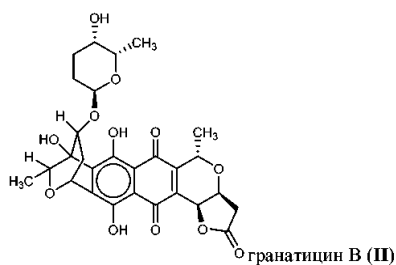
3. Применение по п.1, где злокачественная опухоль содержит генетическую мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации RAS, мутации EGFR, мутации KRAS, мутации p53, мутации BRAF, мутации EVI1, мутации Flt-3, мутации WT-1, мутации циклина D, мутации PTEN, мутации ABL киназы и хромосомного нарушения.

4. Применение по п.1, где злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль.

5. Применение по п.1, где злокачественной опухолью является рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.

6. Применение по п.1, где лечение дополнительно включает проведение лучевой терапии.

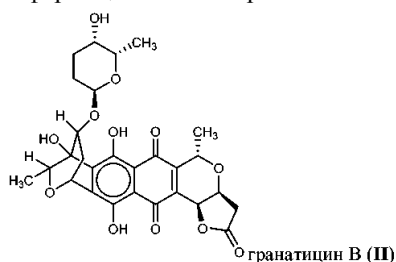
7. Применение фармацевтической композиции для лечения или предотвращения рака у человека, содержащей фармацевтически приемлемый наполнитель и соединение формулы (II)



или его фармацевтически приемлемую соль,

где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы, меланому, острый миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или острый бифенотипический лейкоз.

8. Применение набора для лечения или предотвращения рака у человека, включающего фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, соединение формулы (II)



или его фармацевтически приемлемую соль,

и инструкцию по её введению человеку для лечения или предотвращения рака, где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы, меланому, острый миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз или острый бифенотипический лейкоз.

9. Применение по п.1, где соединение вводят посредством системной внутривенной инъекции в режиме болюса или непрерывной инфузии.

10. Применение по п.7, где композиция составлена для системной внутривенной инъекции в режиме болюса или непрерывной инфузии.

11. Применение по п.1, где рак представляет собой острый миелолейкоз.

12. Применение по п.11, где острый миелолейкоз представляет собой острый мегакариобластный лейкоз или промиелоцитарный лейкоз.

13. Применение по п.1, где рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз.

14. Применение по п.1, где рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

15. Применение по п.1, где рак представляет собой острый бифенотипический лейкоз.

16. Применение по п.1, где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы или меланому.

17. Применение по п.7, где рак представляет собой острый миелолейкоз.

18. Применение по п.17, где острый миелолейкоз представляет собой острый мегакариобластный лейкоз или промиелоцитарный лейкоз.

19. Применение по п.7, где рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз.

20. Применение по п.7, где рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.

21. Применение по п.7, где рак представляет собой острый бифенотипический лейкоз.

22. Применение по п.7, где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы или меланому.

23. Применение по п.7, где злокачественная опухоль содержит генетическую мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации RAS, мутации EGFR, мутации KRAS, мутации p53, мутации BRAF, мутации EVI1, мутации Flt-3, мутации WT-1, мутации циклина D, мутации PTEN, мутации ABL киназы и хромосомного нарушения.

24. Применение по п.7, где злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль.

25. Применение по п.7, где злокачественной опухолью является рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.

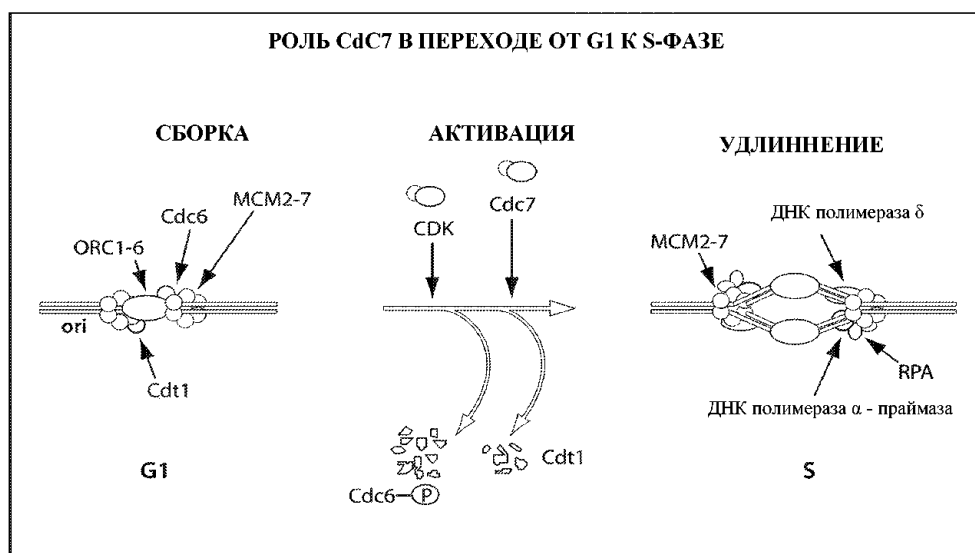
26. Способ по п.2, где лечение дополнительно включает проведение лучевой терапии.

27. Способ по п.2, где соединение вводят посредством системной внутривенной инъекции в режиме болюса или непрерывной инфузии.

28. Способ по п.2, где рак представляет собой острый миелолейкоз.

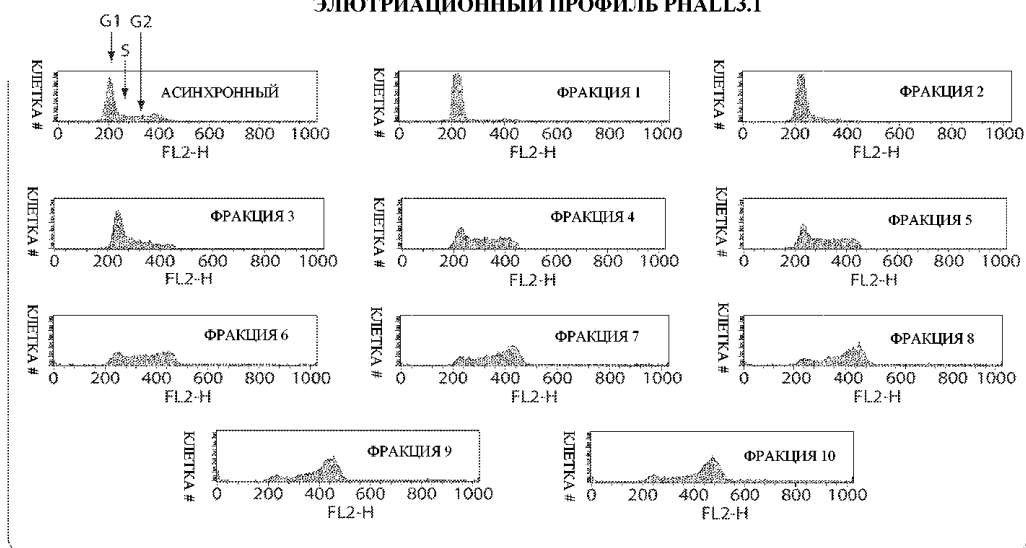
29. Способ по п.28, где острый миелолейкоз представляет собой острый мегакариобластный лейкоз или промиелоцитарный лейкоз.

30. Способ по п.2, где рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз.
31. Способ по п.2, где рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.
32. Способ по п.2, где рак представляет собой острый бифенотипический лейкоз.
33. Способ по п.2, где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы или меланому.
34. Способ по п.2, где злокачественная опухоль содержит генетическую мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации RAS, мутации EGFR, мутации KRAS, мутации p53, мутации BRAF, мутации EVI1, мутации Flt-3, мутации WT-1, мутации циклина D, мутации PTEN, мутации ABL киназы и хромосомного нарушения.
35. Способ по п.2, где злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль.
36. Способ по п.2, где злокачественной опухолью является рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.
37. Применение по п.8, где соединение вводят посредством системной внутривенной инъекции в режиме болюса или непрерывной инфузии.
38. Применение по п.8, где рак представляет собой острый миелолейкоз.
39. Применение по п.38, где острый миелолейкоз представляет собой острый мегакариобластный лейкоз или промиелоцитарный лейкоз.
40. Применение по п.8, где рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз.
41. Применение по п.8, где рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз.
42. Применение по п.8, где рак представляет собой острый бифенотипический лейкоз.
43. Применение по п.8, где рак представляет собой рак легких, рак яичников, рак щитовидной железы или меланому.
44. Применение по п.8, где злокачественная опухоль содержит генетическую мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутации RAS, мутации EGFR, мутации KRAS, мутации p53, мутации BRAF, мутации EVI1, мутации Flt-3, мутации WT-1, мутации циклина D, мутации PTEN, мутации ABL киназы и хромосомного нарушения.
45. Применение по п.8, где злокачественной опухолью является устойчивая к нескольким лекарственным средствам (MDR) злокачественная опухоль.
46. Применение по п.8, где злокачественной опухолью является рецидивная и/или рефрактерная злокачественная опухоль.



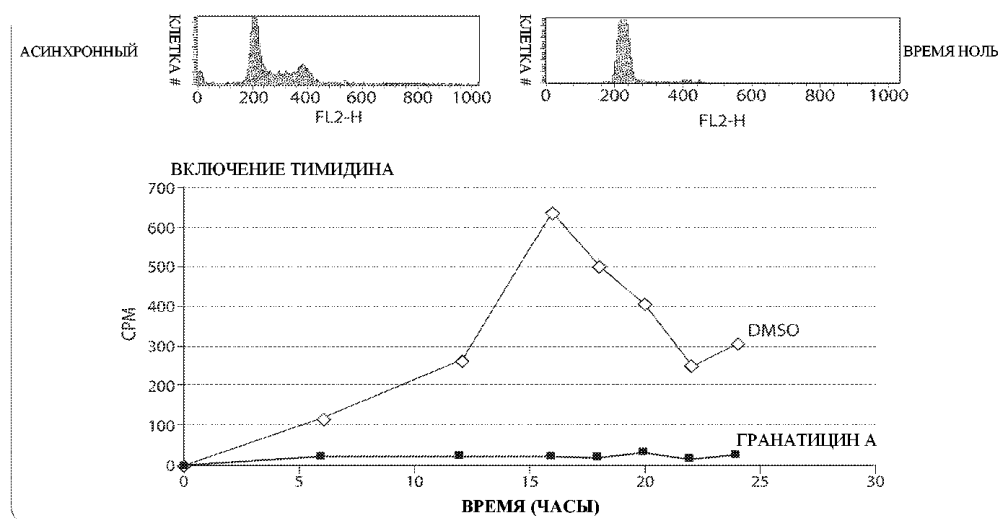
Фиг. 1

ЭЛЮТРИАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ RHAL3.1

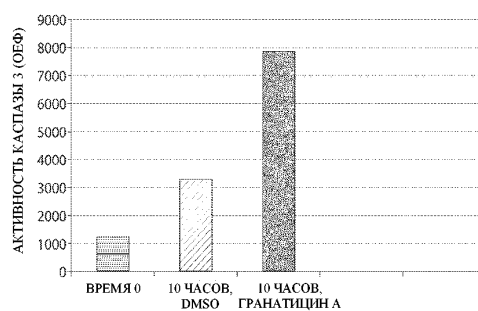


Фиг. 2

ГРАНАТИЦИН А ИНГИБИРУЕТ ПЕРЕХОД ОТ G1 К S-ФАЗЕ

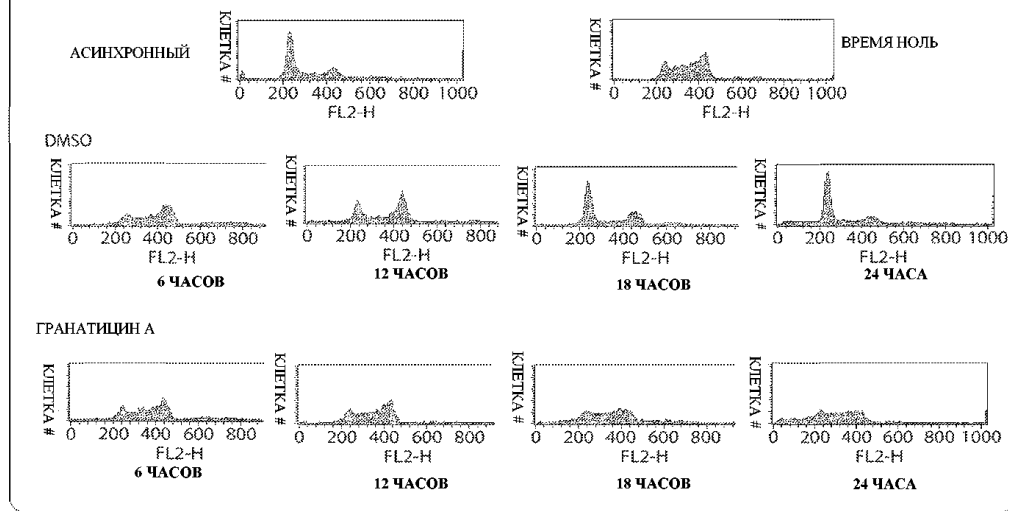


Фиг. 3

ГРАНАТИЦИН А ИНДУЦИРУЕТ
ОПОСРЕДОВАННЫЙ КАСПАЗОЙ 3 АПОПТОЗ

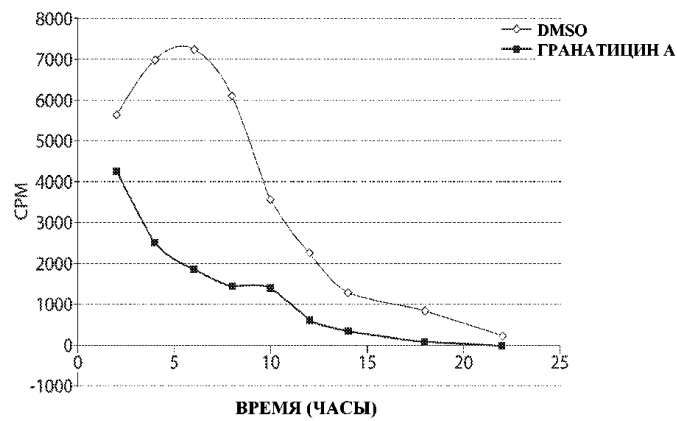
Фиг. 4

ГРАНАТИЦИН А ИНДУЦИРУЕТ ЗАДЕРЖКУ И АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ В S-ФАЗЕ



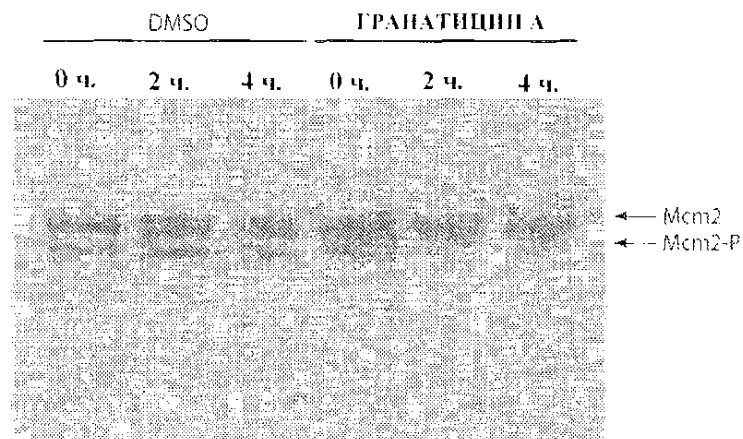
Фиг. 5

ВКЛЮЧЕНИЕ ТИМИДИНА В S-ФАЗЕ

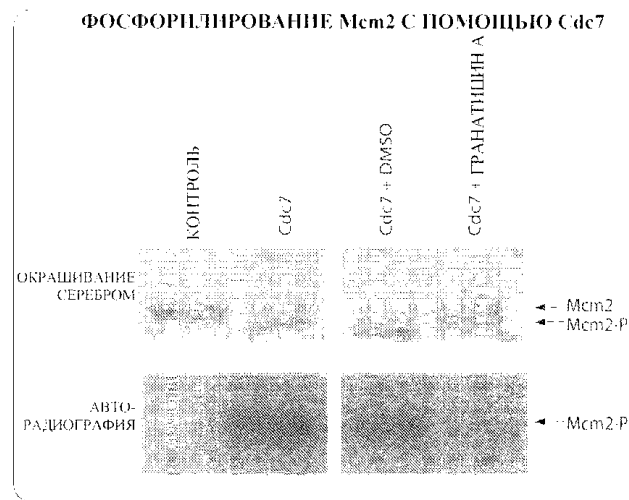


Фиг. 6

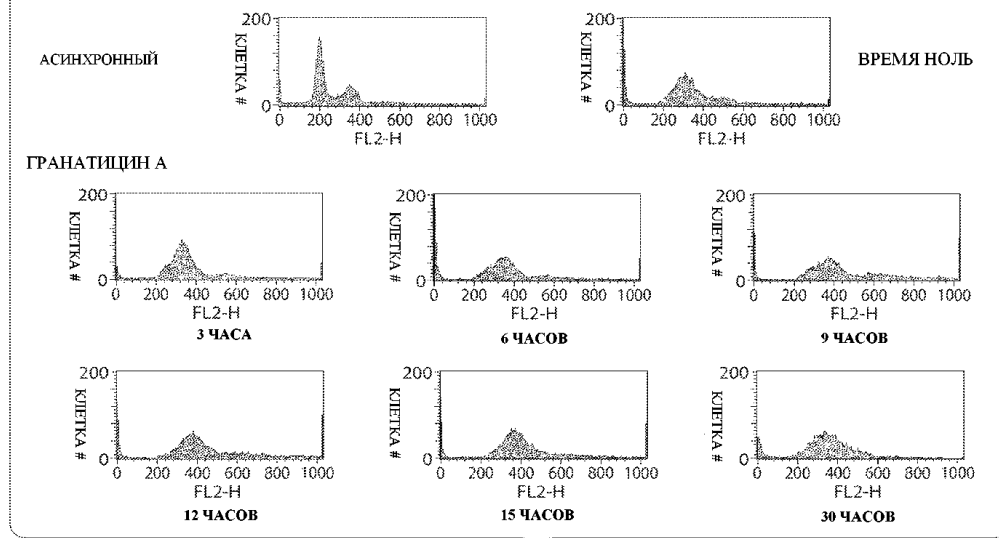
ГРАНАТИЦИН А ИНГИБИРУЕТ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ Mcm2



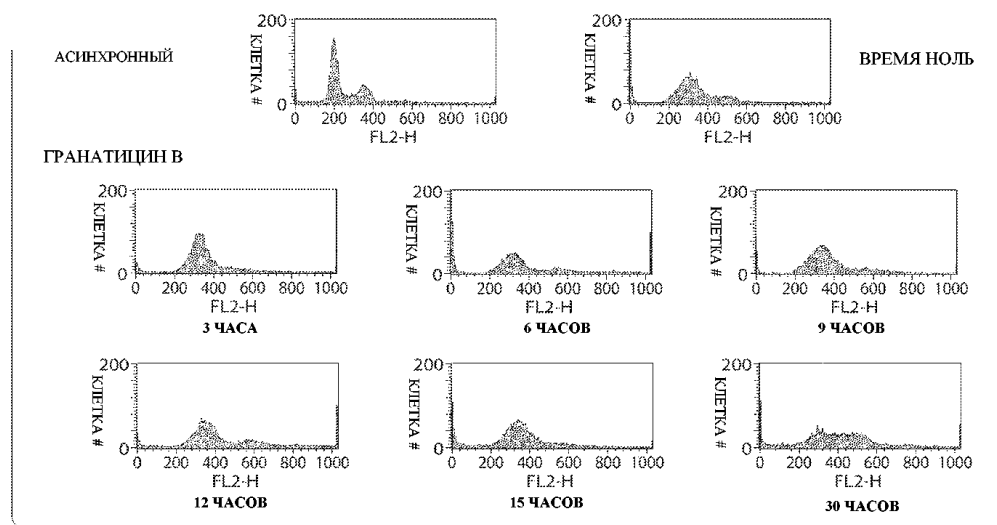
Фиг. 7



Фиг. 8

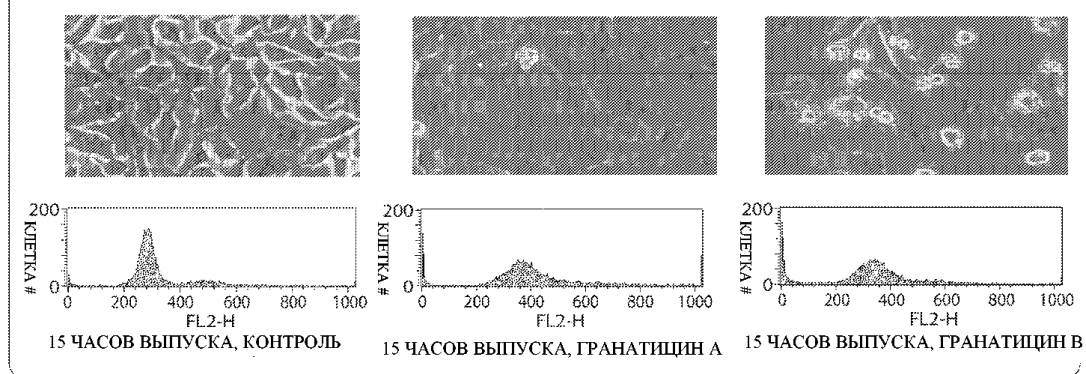
ГРАНАТИЦИН А ИНДУЦИРУЕТ ЗАДЕРЖКУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В КЛЕТКАХ Hela S3

Фиг. 9

ГРАНАТИЦИН В ИНДУЦИРУЕТ ЗАДЕРЖКУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА Hela S3

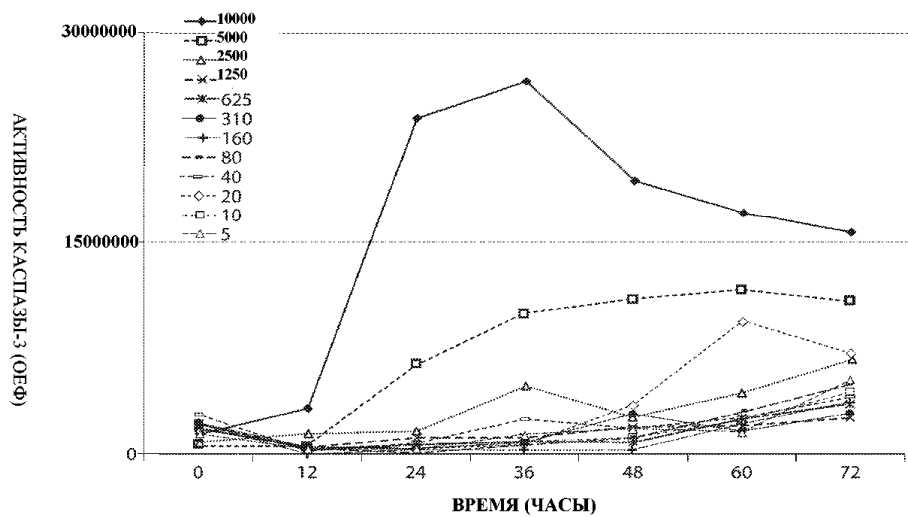
Фиг. 10

ЗАДЕРЖКА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В КЛЕТКАХ Hela S3



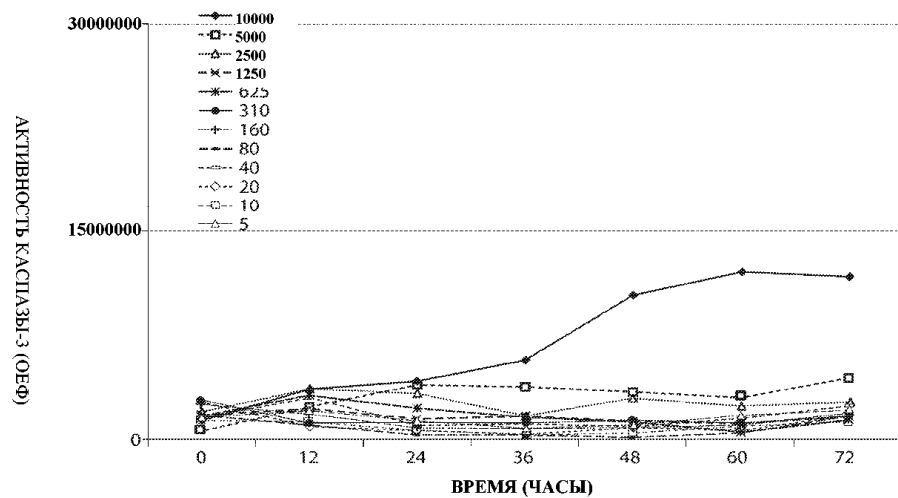
Фиг. 11

ИНДУЦИРОВАННАЯ ГРАНАТИЦИНОМ А КАСПАЗНАЯ-3 АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ Hela



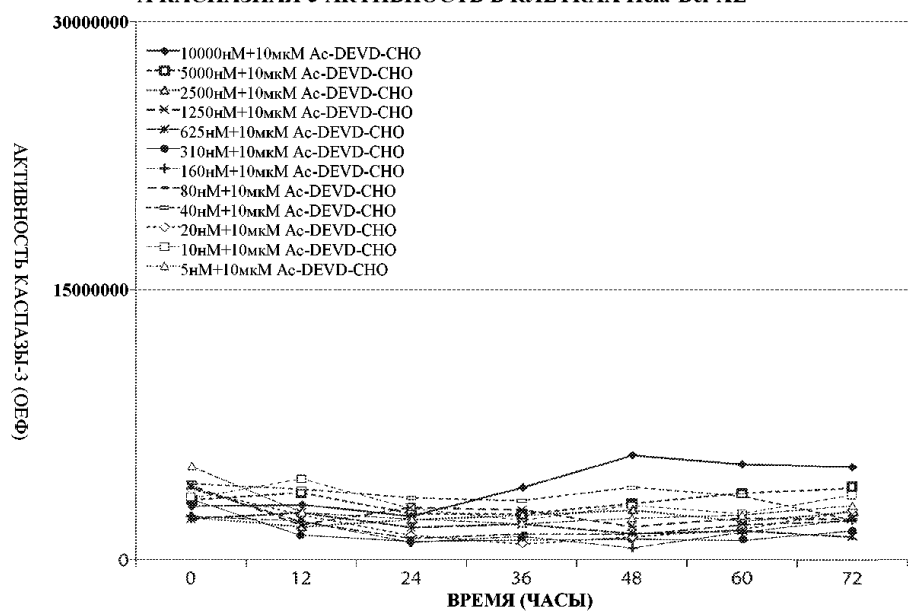
Фиг. 12

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ Bcl-XL СНИЖЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГРАНАТИЦИНОМ А КАСПАЗНОЙ-3 АКТИВНОСТИ В КЛЕТКАХ Hela Bcl-XL

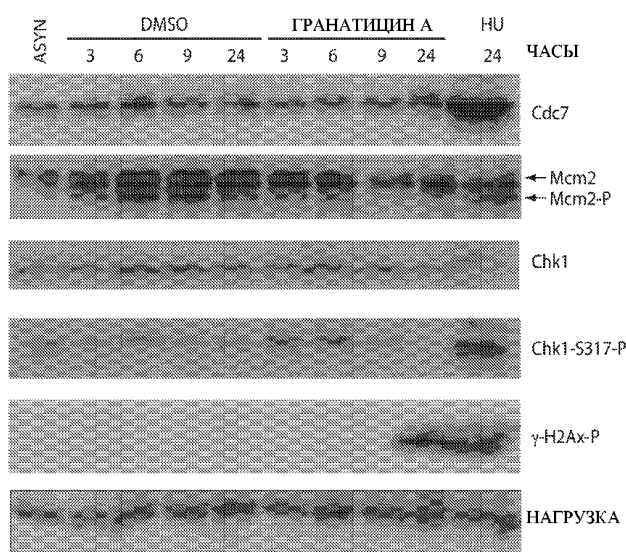


Фиг. 13

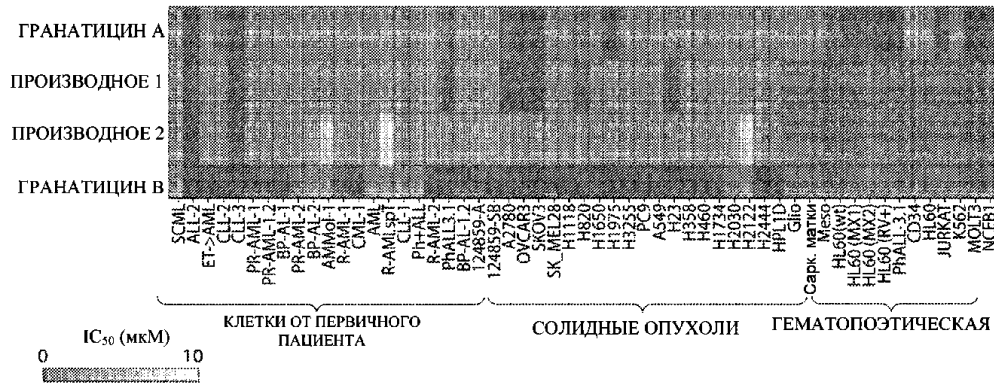
**БЛОКИРОВАННАЯ ИНГИБИТОРОМ Ас-DEVD-CHO ИНДУЦИРОВАННАЯ ГРАНАТИЦИНОМ
А КАСПАЗА-3 АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ Hela-Bcl-XL**



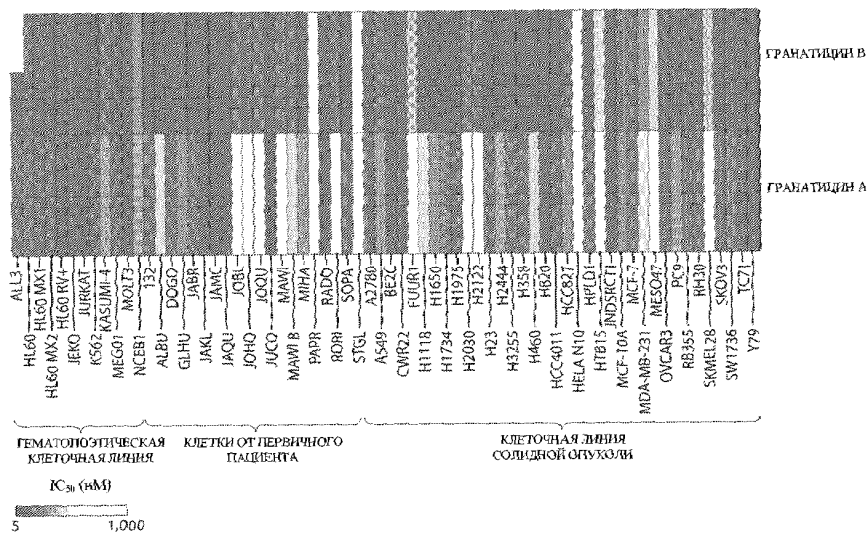
**ГРАНАТИЦИН А НЕ АКТИВИРУЕТ
КОНТРОЛЬНУЮ ТОЧКУ S-ФАЗЫ В КЛЕТКАХ Hela**



**ГРАНАТИЦИН А И В И ПРОИЗВОДНЫЕ 1 И 2 ИНГИБИРУЮТ
МНОЖЕСТВЕННЫЕ ТИПЫ ОПУХОЛИ**

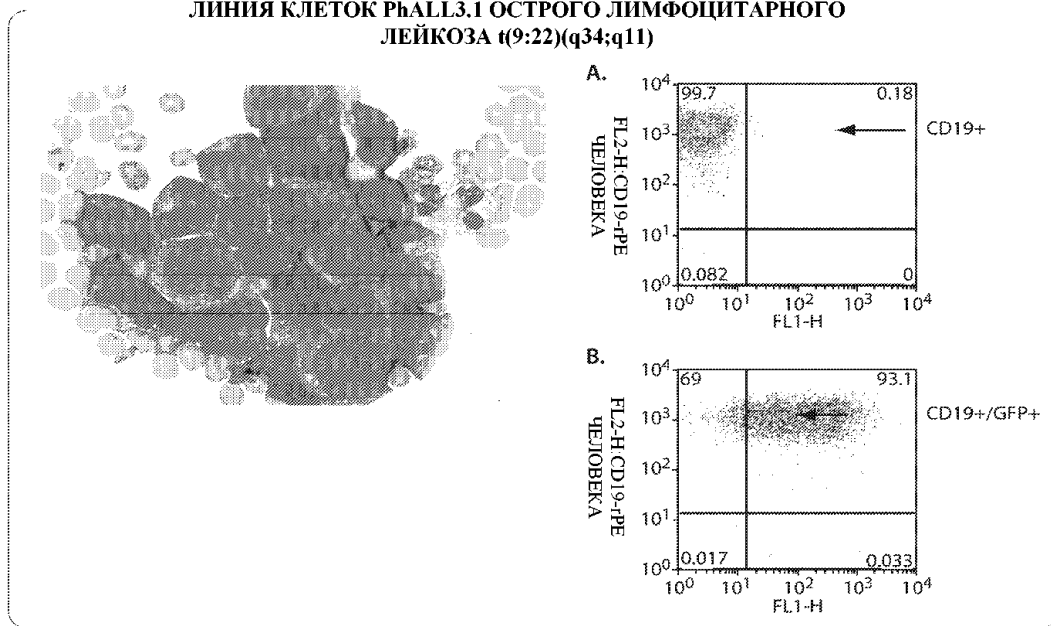


Фиг. 16А



Фиг. 16В

**ЛИНИЯ КЛЕТОК PhALL3.1 ОСТРОГО ЛИМФОЦИТАРНОГО
ЛЕЙКОЗА t(9;22)(q34;q11)**



Фиг. 17

ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШИ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК



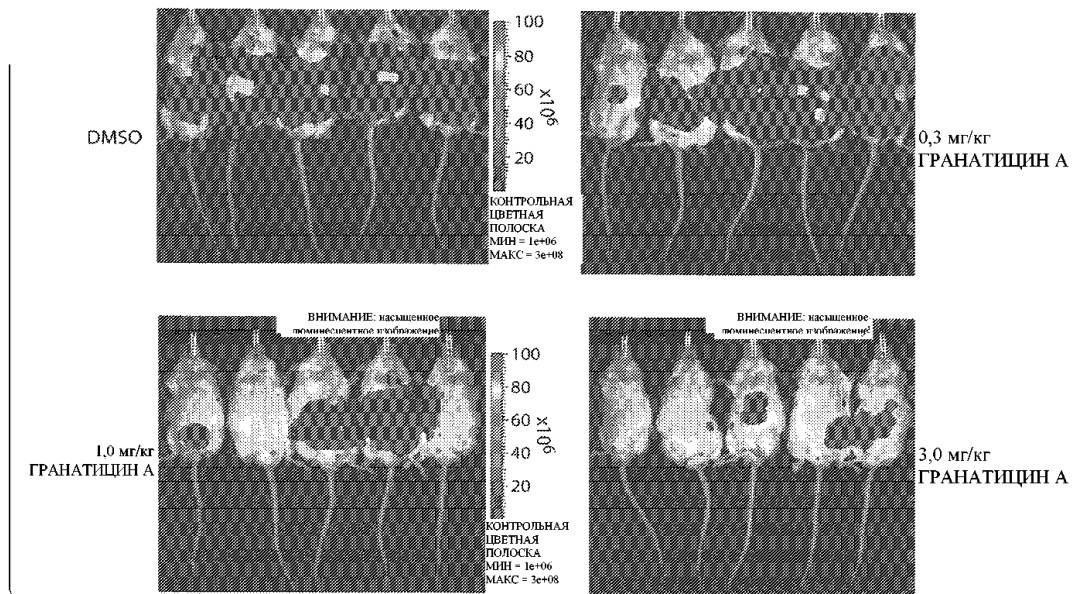
Фиг. 18А



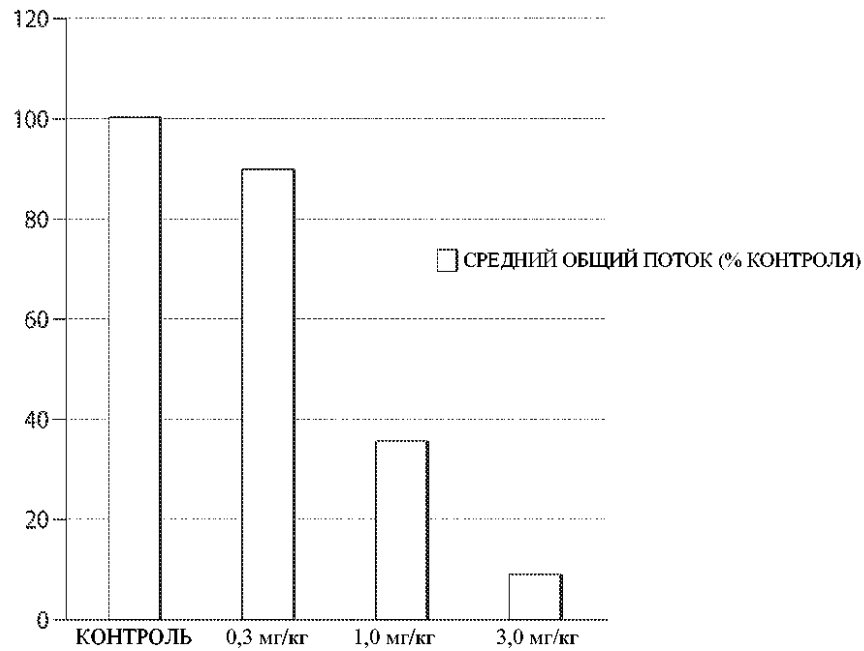
Фиг. 18В

ДЕНЬ 16

ГРАНАТИЦИН А ИНГИБИРУЕТ РОСТ Ph+ALL3.1 IN VIVO

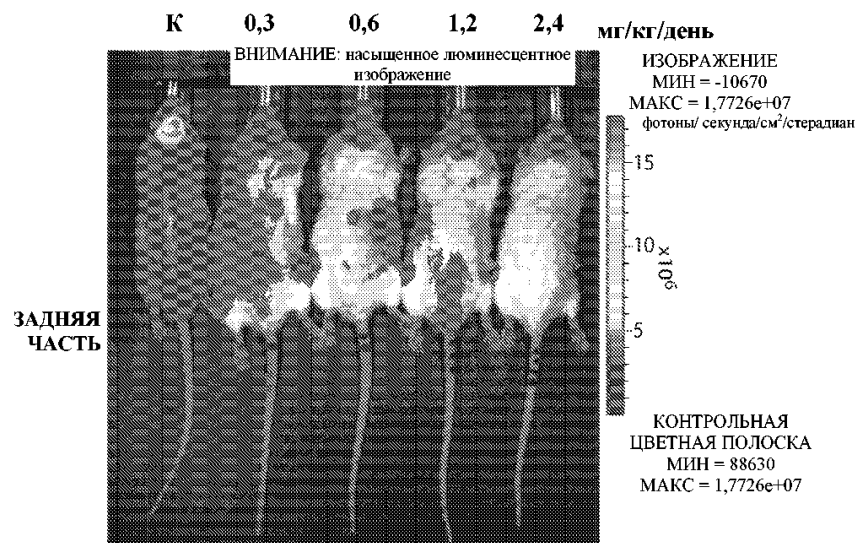


Фиг. 19А

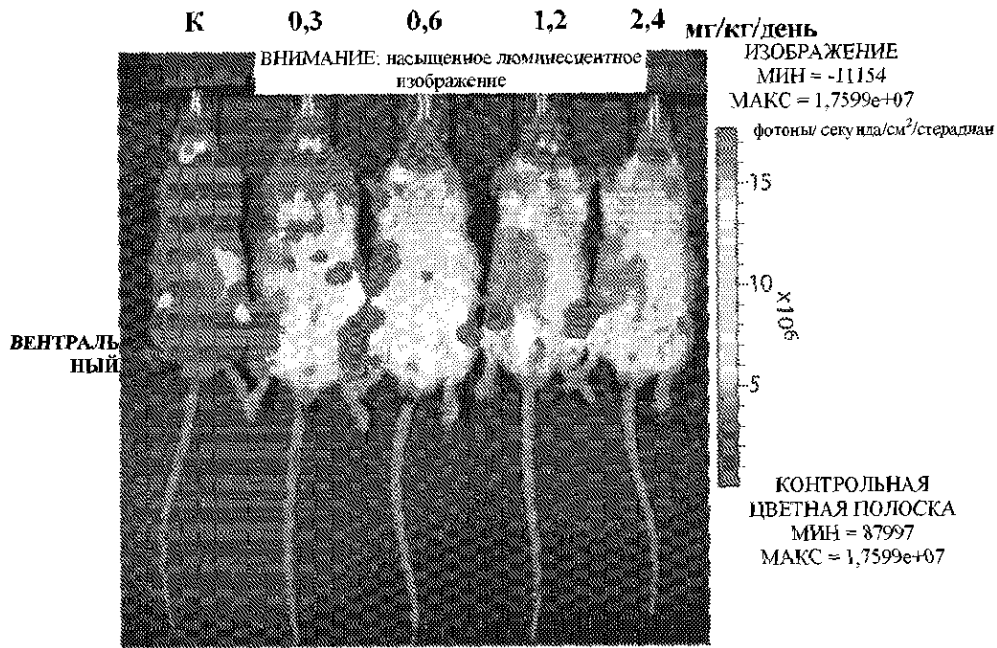


Фиг. 19В

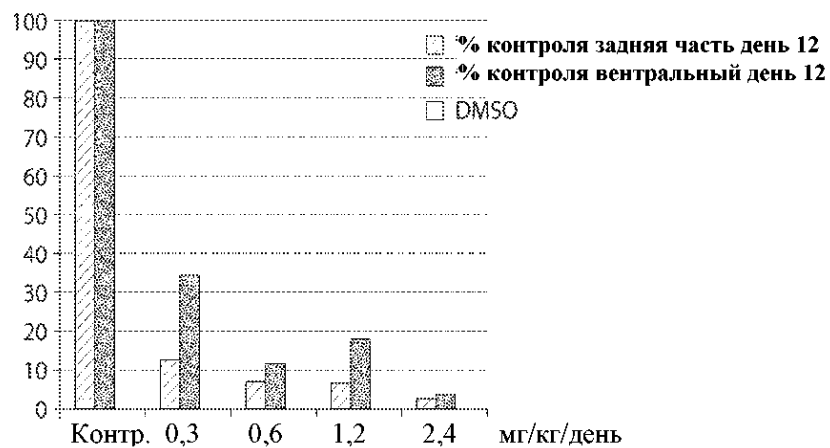
**ГРАНАТИЦИН В ИНГИБИРУЕТ РОСТ PH-ALL3.1 IN VIVO
ИСПОЛЬЗУЯ НЕПРЕРЫВНЫЙ РЕЖИМ ИНФУЗИИ В ТЕЧЕНИЕ 7 ДНЕЙ**



Фиг. 20А

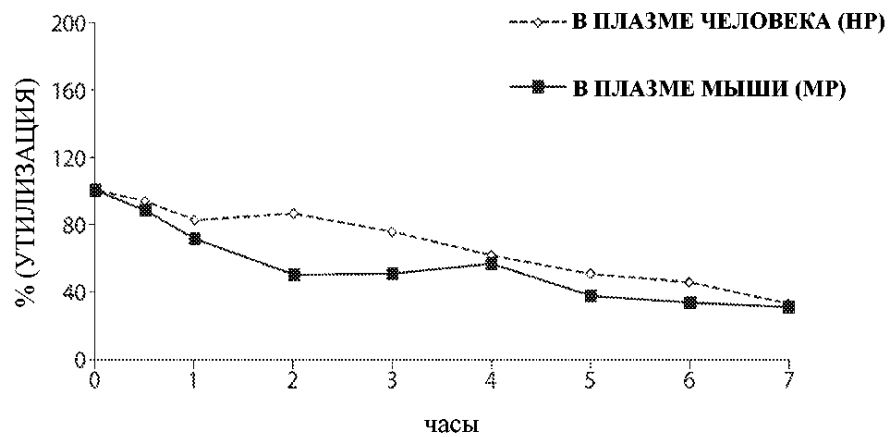


Фиг. 20В



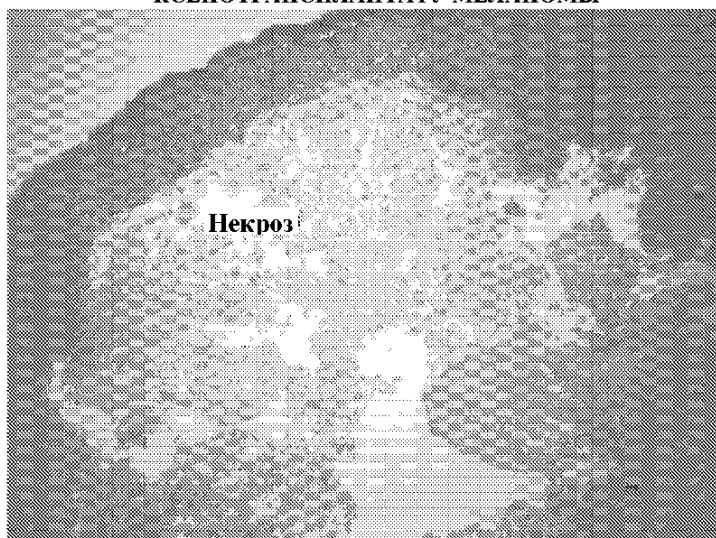
Фиг. 20С

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ГРАНАТИЦИНА В ПРИ СРАВНЕНИИ В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ



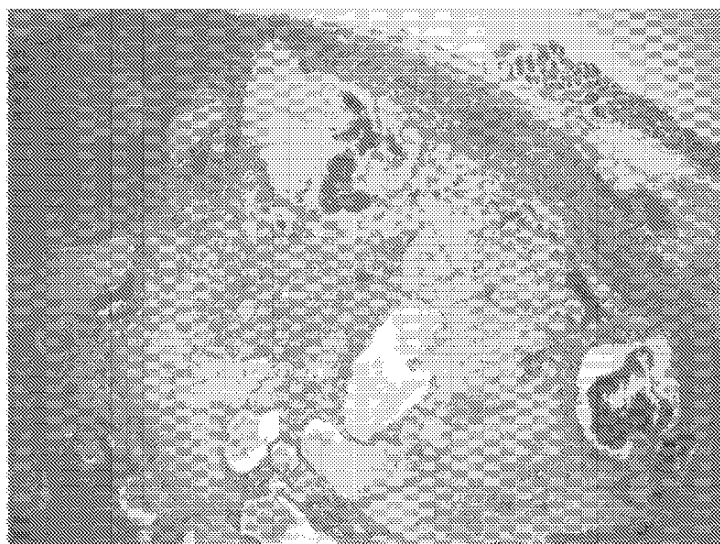
Фиг. 21

**ГРАНАТИЦИН В ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ ПО ОТНОШЕНИЮ К
КСЕНОТРАНСПЛАНТАТУ МЕЛАНОМЫ**



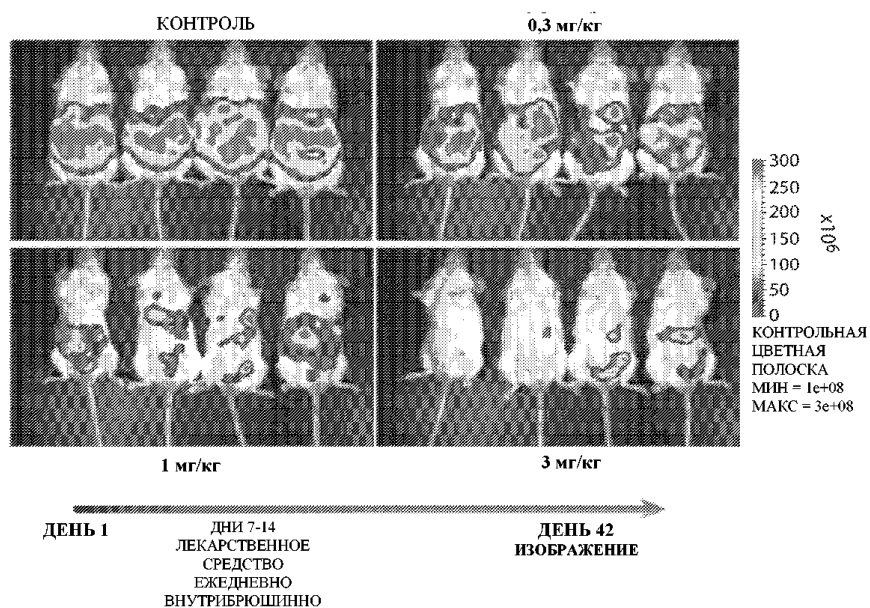
Фиг. 22А

**ГРАНАТИЦИН В ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ ПО ОТНОШЕНИЮ К
КСЕНОТРАНСПЛАНТАТУ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОЙ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ ЛЕГКОГО**



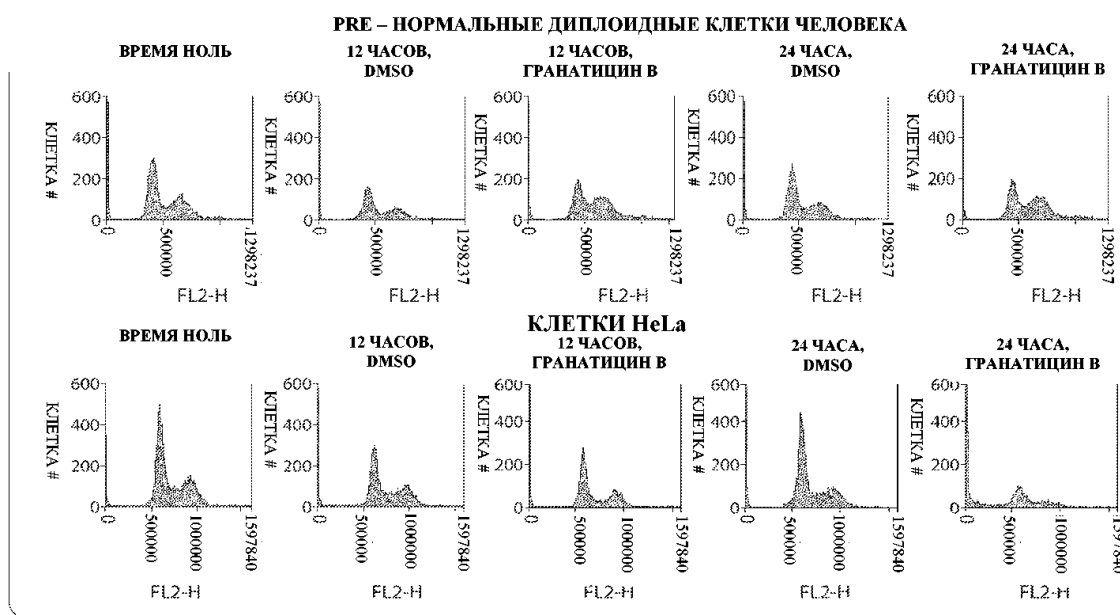
Фиг. 22В

**ГРАНАТИЦИН В ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ ПО ОТНОШЕНИЮ
К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ ОПУХОЛЯМ ЯИЧНИКА**

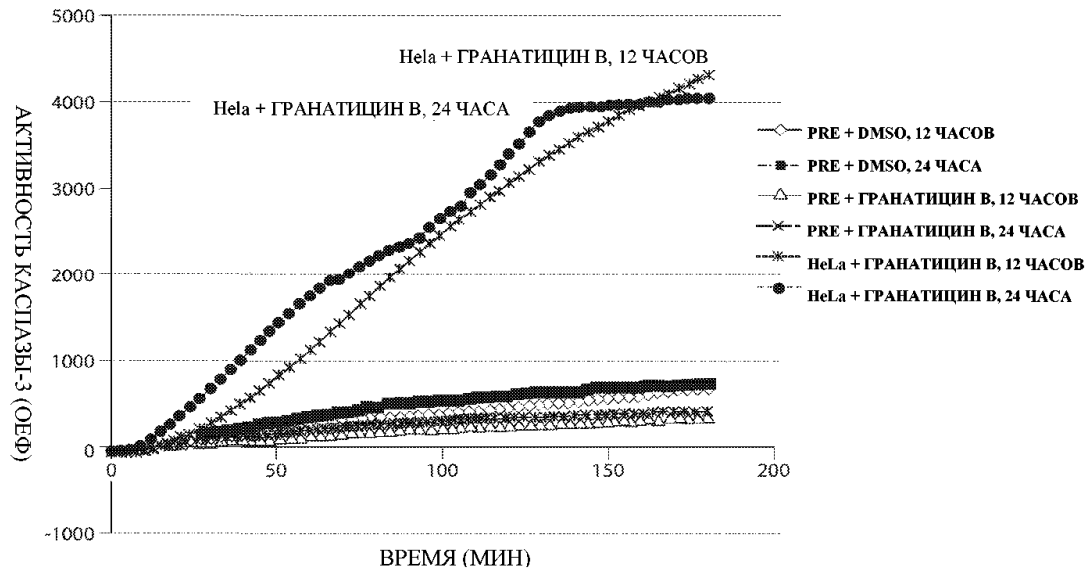


Фиг. 22С

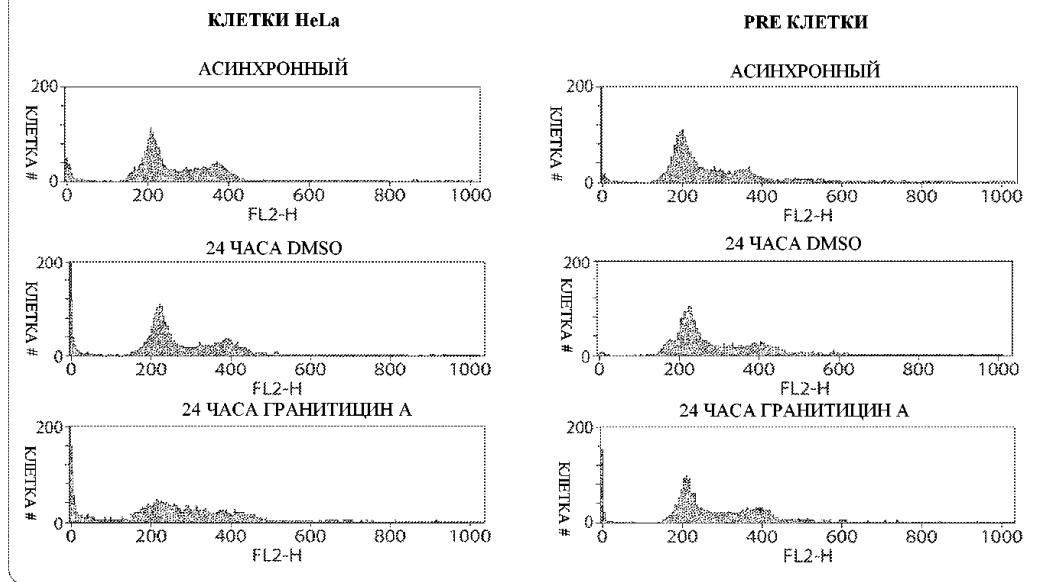
**ГРАНАТИЦИН В НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЦИТОТОКСИЧНЫМ ПО ОТНОШЕНИЮ К
НОРМАЛЬНЫМ ДИПЛОИДНЫМ КЛЕТКАМ**



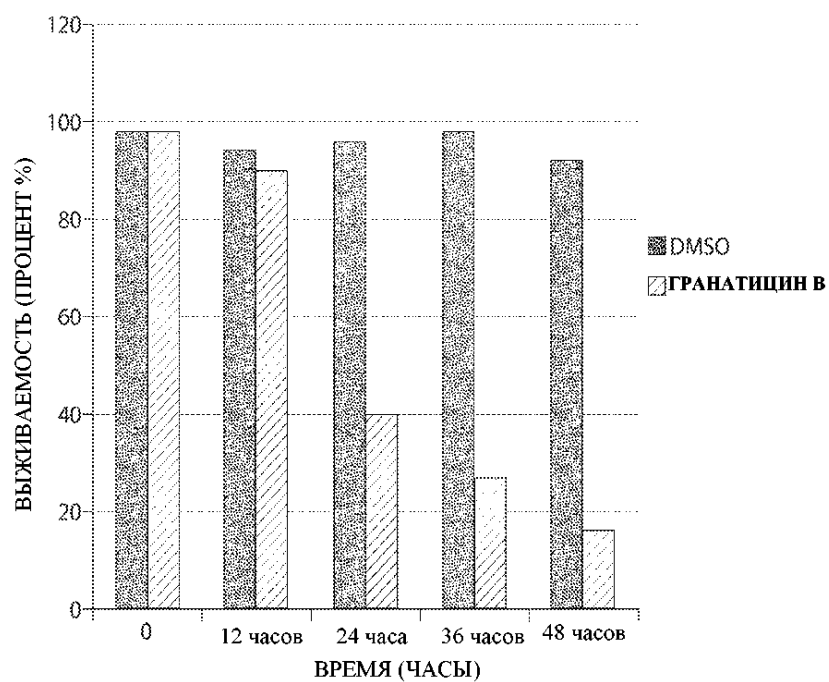
Фиг. 23А



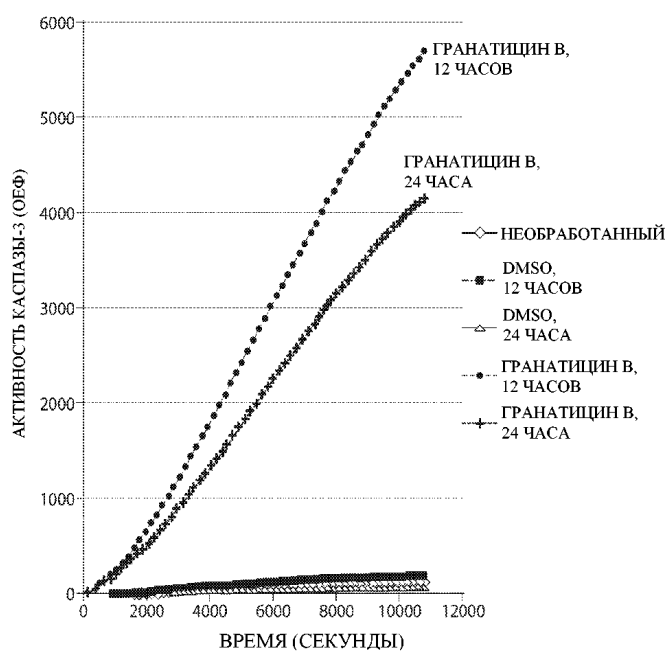
**ГРАНАТИЦИН А НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЦИТОТОКСИЧНЫМ ПО
ОТНОШЕНИЮ К НОРМАЛЬНЫМ ДИПЛОИДНЫМ КЛЕТКАМ**



ГРАНАТИЦИН В ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ПО ФИЛАДЕЛЬФИЙСКОЙ ХРОМОСОМЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ИЗВЕСТНЫМИ УСТОЙЧИВЫМИ К ИМАТИНИБУ МУТАЦИЯМИ В КИНАЗЕ Bcr-Abl



Фиг. 24А



Фиг. 24В

