РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 519 145**(13) **C2**

(51) МПК
A61K 31/433 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011119427/15, 16.10.2009**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.10.2009

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
16.10.2008 US 61/106,086

(43) Дата публикации заявки: **27.11.2012** Бюл. № **33**

(45) Опубликовано: **10.06.2014** Бюл. № **16**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 2006/0100161, A1, 11.05.2006. US 2006/0009500, A1, 12.01.2006. WO 2008/060578, A2, 22.05.2008. WO 2006/044825, A2, 27.04.2006. RU 2327696, C2, 27.06.2008**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **16.05.2011**

(86) Заявка PCT:
US 2009/061106 (16.10.2009)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2010/045624 (22.04.2010)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент"

(72) Автор(ы):
ТАНКВИСТ Браян Дж. (US),
ВОКЕР Дункан Х. (US),
ВОСНЕР Ричард Дональд (US)

(73) Патентообладатель(и):
ЭРРЭЙ БИОФАРМА ИНК. (US)

(54) ИНГИБИТОРЫ МИТОЗА ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА АПОПТОЗА ПРИ ТЕРАПИИ

(57) Реферат:

Применение соединения (S)-2-(3-аминопропил)-5-(2,5-дифторфенил)-N-метокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамида в максимально переносимой дозе для интенсификации после ее введения процесса апоптоза клеток у пациента, имеющего патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной этим же соединением. Изобретение обеспечивает высокую эффективность апоптоза. 16 з.п. ф-лы, 19 ил., 11 пр.

RU 2519145 C2

RU 2519145 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 519 145**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 31/433 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011119427/15, 16.10.2009**

(24) Effective date for property rights:
16.10.2009

Priority:
(30) Convention priority:
16.10.2008 US 61/106,086

(43) Application published: **27.11.2012** Bull. № **33**

(45) Date of publication: **10.06.2014** Bull. № **16**

(85) Commencement of national phase: **16.05.2011**

(86) PCT application:
US 2009/061106 (16.10.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/045624 (22.04.2010)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent"

(72) Inventor(s):
TANKVIST Brajan Dzh. (US),
VOKER Dunkan Kh. (US),
VOSNER Richard Donal'd (US)

(73) Proprietor(s):
EhRREhJ BIOFARMA INK. (US)

RU 2519145 C2

(54) MITOSIS INHIBITORS FOR INTENSIFICATION OF APOPTOSIS PROCESS IN THERAPY

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: application of compound (S)-2-(3-aminopropyl)-5-(2,5-difluorophenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thiadiazole-3(2H)-carboxamide in maximally tolerable dose for intensification of process of apoptosis of patient's cells, having pathogenic cells in state of delay in mitosis, induced by said compound, after its introduction.

EFFECT: invention ensures high efficiency of apoptosis.

17 cl, 19 dwg, 11 ex

RU 2519145 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к ингибитору митоза для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной митотическим ингибитором, для интенсификации процесса апоптоза клеток.

Уровень техники

Ингибиторы митоза (также называемые митотическими ингибиторами или антимитотиками) представляют собой важные терапевтические средства для лечения заболеваний, и они применяются при лечении злокачественных новообразований, а также в качестве противоподагрических и противогрибковых средств и для лечения рестеноза. Эти терапевтические средства-ингибиторы митоза нарушают митоз, что приводит к потере клеткой способности к делению. При злокачественном новообразовании ингибиторы митоза останавливают злокачественный рост и приводят к апоптозу или выводят из митоза с последующей смертью клетки.

Известно много ингибиторов митоза. Некоторые ингибиторы митоза представляют собой антитубулиновые средства. Антитубулиновые средства действуют на тубулин, белок, который необходим для митоза. Антитубулиновые средства включают алкалоиды барвинка, таксаны и эпотилоны. Ингибиторы митоза, направленные на нетубулиновые мишени, также исследовали в качестве противораковых терапевтических средств. Различные ингибиторы митоза воздействуют на различные участки клеточного цикла и иногда на другие функции, не имеющие отношения к митозу. Например, антитубулиновые средства могут воздействовать на немитотические функции цитоскелета в пролиферирующих клетках и в терминально дифференцированных клетках. Периферическая нейротоксичность ассоциирована с тубулиновыми средствами. Таким образом, различные ингибиторы митоза могут обладать различными токсичностями.

Алкалоиды барвинка ингибируют полимеризацию микротрубочек, что, таким образом, ингибирует митоз. Алкалоиды барвинка включают винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин. Винбластин применяют для лечения определенных типов злокачественных новообразований, включая лимфому Ходжкина, немелкоклеточный рак легкого, рак груди и рак яичка. Винкристин применяют для лечения определенных типов злокачественных новообразований, включая лимфому, рак легкого и острый лимфобластный лейкоз. Винбластин и винкристин также применяют в качестве паллиативных средств для некоторых основных солидных опухолей (см. Wood, Kenneth W. et al. "Past and future of the mitotic spindle as an oncology treatment." Current Opinion in Pharmacology. Vol. I, Issue 4 (August 1, 2001): pp.370-377). Виндезин применяют для лечения определенных типов злокачественных новообразований, включая лейкоз, лимфому, меланому, рак груди и рак легкого. Винорелбин применяют для лечения определенных типов рака, включая рак груди и немелкоклеточный рак легкого.

Таксаны стабилизируют микротрубочки и тем самым инактивируют функцию микротрубочек клетки и ингибируют клеточное деление. Таксаны включают паклитаксел (включая Абраксан*) и доцетаксел. Паклитаксел применяют для лечения определенных типов злокачественных новообразований, включая рак легкого, рак яичников, рак груди и последние стадии саркомы Капоши. Доцетаксел применяют для лечения определенных типов злокачественных новообразований, включая рак груди, рак яичников и немелкоклеточный рак легкого. Также в стадии разработки находятся новые таксаны, например BMS275183 (См. 2006 EJC Poster: Broker, L.E., et al. "The novel oral taxanes BMS275183 has a favorable activity and toxicity profile in a twice weekly schedule; Preliminary findings from an extended phase 1 trial." EJC Suppl. 2006 Abstract 644, p.194).

Кроме того, ингибитором митоза является колхицин, который действует в качестве антитубулинового средства. Колхицин ингибирует митоз путем ингибирования полимеризации микротрубочек. Колхицин применяют для лечения подагры.

Эпотилоны представляют собой класс стабилизирующих микротрубочки химиотерапевтических средств с активностью в устойчивых к паклитакселу линиях злокачественных клеток (см. Denduluri, Neelima, et al. "Phase U trial of ixabepilone, an epothilones B analog, given daily for three days every three weeks, in metastatic breast cancer." Invest. New Drugs. 25 (August 25, 2006): pp.63-67). Эпотилоны включают эпотилон A, эпотилон B, эпотилон D и аналог эпотилона иксабепилон. Иксабепилон был улучшен для лечения агрессивного метастазирующего или локального прогрессирующего рака груди, не поддающегося более химиотерапевтическим средствам, доступным в настоящее время.

Доластатин и аналоги доластатина представляют собой ингибиторы митоза. Эти соединения включают доластатин 10, доластатин 15, синтадотин (или SYN-D или ILX651; см. 2004 ASCO Abstract No. 3068, Hammond, L.A., et al. "Phase (Ph) 1 evaluation of the dolastatin analogue synthadotin (SYN-D; ILX651): Pooled data analysis of three alternate schedules in patients (pts) with advanced solid tumors." J. Clin. Oncology. 2004 Suppl. Abstract 3068 14s (2004)), LU 103793 и кемадотин.

Аврора-киназы (Aurora kinases), включающие Аврора A, Аврора B и Аврора C, представляют собой серин/треонин-киназы, которые функционируют в митозе. Аврора-киназы были намечены в качестве мишеней ингибиторов митоза. Аврора A действует в профазе митоза и требуется для корректного функционирования центросом. Аврора B действует при прикреплении митотического веретена к центромере. Ингибиторы Аврора-киназ включают AZD-1152, CYC-116, AS-703569 (или R-763). MLN-8054, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076 (или ENMD-981693), PHA-739385, МК-0457 (или VX-680) и МК-5108 (или VX-689). Для большей информации см.: Gautschi, Oliver, et al. "Aurora Kinases as Anticancer Drug Targets." Clin. Cancer Res. 14(6) (March 15, 2008): pp.1639-48.

Полоподобные киназы (Polo-like-kinases - «Plks»), включающие полоподобную киназу 1 ("Plk1"), полоподобную киназу 2 ("Plk2"), полоподобную киназу 3 ("Plk3") и полоподобную киназу 4 ("Plk4"), вовлечены в образование и изменения в митотическом веретене и в активацию комплексов CDK/циклин во время митоза. Полоподобные киназы были намечены в качестве мишеней ингибиторов митоза. Ингибиторы полоподобных киназ включают ON-OI910Na (или "ON-1910Na или Onc-01910), BI-2536 (см.: Stecgmaier, Martin, et al. "Bl 2536, a Potent and Selective Inhibitor of Polo-like Kinase 1, Inhibits Tumor Growth In Vivo." Current Biology. 17 (February 20, 2007): pp.316-322) и GSK-461364 (или GSK-461364A).

Кинезины представляют собой тип моторных белков. Митотические кинезины представляют собой ферменты, необходимые для сборки и функционирования митотического веретена. Митотические кинезины играют существенную роль во всех фазах митоза. Во время митоза кинезины организуют микротрубочки в биполярную структуру, которая представляет собой митотическое веретено. Ингибирование митотического кинезина вызывает неправильное образование или дисфункцию митотического веретена, часто приводящую к задержке клеточного цикла и к апоптозу (клеточной смерти).

Среди идентифицированных митотических кинезинов есть кинезиновый белок веретена (kinesin spindle protein - «KSP»). Во время митоза KSP связывается с микротрубочками митотического веретена, а ингибирование KSP предотвращает

разделение полюсов веретена во время прометафазы с получением монополярных веретен, что вызывает задержку в митозе и индукцию программируемой клеточной смерти. Человеческий KSP также имеет название HsEg5.

В патентной заявке США 2006/0100161 описаны соединения, включающие 2-(3-аминопропил)-5-(3-фторфенил)-N-(2-метоксиэтил)-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-кабоксамид (далее «Соединение 1»), 2-(3-аминопропил)-5-(3-фторфенил)-N-метокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамид (далее «Соединение 2»), 2-(3-аминопропил)-5-(2,5-дифторфенил)-N-метокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамид (далее «Соединение 3»), (S)-2-(3-аминопропил)-5-(2,5-дифторфенил)-N-метокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамид (далее «Соединение 4»), (R)-2-(3-аминопропил)-5-(2,5-дифторфенил)-N-метокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамид (далее «Соединение 5») и 2-(3-аминопропил)-5-(2,5-дифторфенил)-N-гидрокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамид (далее «Соединение 6»). Соединения 1, 2, 3, 4, 5 и 6 (вместе «161 KSP-Ингибиторы») являются ингибиторами KSP.

Ингибиторы KSP включают испинесиб (или SB-715992 или СК-0238273; см. 2008 ASCO Poster: "A Phase I-11 Open-Label Trial of Ispinesib on an Alternating Dosing Schedule in Chemotherapy-Na[iota]ve Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer (MBC)." www.cytokinetics.com/pdf/ASCO2008A.pdf), '161 ингибиторы KSP, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085 и ARQ 621. Испинесиб тестировали в широком спектре типов опухолей, и он был протестирован в клинических испытаниях на человеке.

Среди других моторных белков, которые действуют во время митоза, также были описаны низкомолекулярные ингибиторы для ассоциированного с центромерой белка E («CENP-E»), CENP-E является моторным белком (см. Chan, G.K.T., et al. "Characterization of the Kinetochore Binding Domain of CENP-E Reveals Interactions with the Kinetochore Proteins CENP-F and hBUBRI." J. Cell Biology. Vol. 143, No. 1 (October 5, 1998): pp.49-63) и может быть отнесен к типу митотических кинезинов. Ингибиторы CENP-E включают GSK-295 (или GSK-923295).

Для лечения заболеваний в качестве терапевтических средств было протестировано множество ингибиторов митоза. Некоторые ингибиторы митоза вводили в однодневном режиме или еженедельно, каждые две недели, каждый месяц и включая 24-часовые инфузии. Введение только одной дозы ингибитора митоза может быть недостаточно для достаточно продолжительного поддержания клетки в состоянии задержки в митозе с тем, чтобы клетки ушли в апоптоз или вышли из митоза и перешли к клеточной смерти. Также некоторые ингибиторы митоза вводили дважды в неделю, три раза в неделю или три раза в месяц. Введение нескольких доз в течение более длительного периода времени часто снижало переносимость пациентами доз, а индивидуальные дозы могут не достигать биологически эффективного уровня.

Раскрытие изобретения

Неожиданно было обнаружено, что после первой дозы ингибитора митоза, вводимой млекопитающему, имеющему патогенные клетки, и после того как клетки входили в состояние задержки в митозе, введение второй дозы ингибитора митоза через один или два дня после первой дозы интенсифицировало апоптоз или выход из митоза с последующей клеточной смертью.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору митоза для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной ингибитором митоза, для интенсификации апоптоза клеток.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагаются '161 KSP-Ингибиторы для

введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированного '161 KSP-Ингибитором, для интенсификации апоптоза клеток.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 представлен эксперимент по нейтрализации апоптоза.

На фигуре 2 представлена активность каспаз 3/7 в зависимости от времени в клетках HT-29 in vitro.

На фигуре 3 представлена активность каспаз 3/7 в зависимости от времени в клетках RPMI 8226 in vitro.

На фигуре 4 представлено количество монополярных веретен в подкожных ксенотрансплантатах клеток HT-29 в голых мышах в различные моменты времени для двух различных режимов дозирования.

На фигуре 5 представлено количество монополярных веретен в подкожных ксенотрансплантатах клеток HT-29 в голых мышах в различные моменты времени для двух различных режимов дозирования.

На фигуре 6 представлено процентное содержание апоптозных клеток в подкожных ксенотрансплантатах клеток HT-29 в голых мышах в различные моменты времени для двух различных режимов дозирования.

На фигуре 7 представлено процентное содержание апоптозных клеток в подкожных ксенотрансплантатах клеток HT-29 в голых мышах в различные моменты времени для двух различных режимов дозирования.

На фигуре 8 представлено процентное содержание клеток с монополярным веретеном и биполярным веретеном в подкожных ксенотрансплантатах в голых мышах через 24 часа и через 48 часов для различных количеств доз.

На фигуре 9 представлено процентное содержание апоптозных клеток в подкожных ксенотрансплантатах HT-29 в голых мышах через 24 часа и через 48 часов для различных количеств доз.

На фигуре 10 представлен эксперимент ингибирования опухолевого роста (tumor growth inhibition - «TGI») в голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 11 представлен TGI-эксперимент на голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 12 представлен TGI-эксперимент на голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 13 представлен TGI-эксперимент на голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 14 представлен TGI-эксперимент на голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 15 представлен TGI-эксперимент голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 16 представлен TGI-эксперимент на голых мышах с подкожными ксенотрансплантатами HT-29.

На фигуре 17 представлено процентное содержание монополярных веретен в подкожных трансплантатах клеток RPM18226 в мышах SCID-beige в различные моменты времени для различных режимов дозирования.

На фигуре 18 представлено процентное содержание апоптозных клеток в подкожных ксенотрансплантатах клеток RPM18226 в мышах SCID-beige в различные моменты времени для различных режимов дозирования.

На фигуре 19 представлено процентное содержание биполярных веретен.

Осуществление изобретения

Далее будет дано подробное упоминание конкретных воплощений изобретения. Хотя изобретение будет описано вместе с пронумерованными воплощениями, понятно, что воплощения не предназначены для ограничения изобретения. Напротив, изобретение предназначено для того, чтобы охватить все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения, определенного пунктами формулы изобретения. Специалисту в данной области очевидны многие методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, которые могут быть применены при практическом осуществлении настоящего изобретения. Настоящее изобретение никоим образом не ограничено описанными способами и материалами. В случае, если одна или несколько из включенных публикаций и подобных материалов отличается от настоящей заявки или противоречит ей, что включает, в частности, определенные термины, применение терминов, описанные методы и тому подобное, то предпочтение будет отдано заявке.

Определения

Термины «злокачественное новообразование» и «злокачественный» относится к физиологическому состоянию млекопитающих или описывает такое состояние, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. «Опухоль» содержит одну или несколько злокачественных клеток. Примеры злокачественного новообразования включают, в частности, карциному, лимфому, бластему, саркому и лейкоз или лимфонеоплазии. Более конкретные примеры таких злокачественных новообразований включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включающий мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого («NSCLC»), аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, печеночно-клеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта или желудочный рак, включая желудочно-кишечный рак, панкреатический рак, глиобластому, цервикальный рак, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак груди, рак толстой кишки, ректальный рак, колоректальный рак, внутриматочную или маточную карциному, карциному слюнной железы, рак почки или почечноклеточный рак, рак простаты, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному анального канала, карциному полового члена, рак кожи, включающий меланому, множественную меланому, и острый миелоидный лейкоз.

Термины «лечить» или «лечение» обозначают терапевтические, профилактические, паллиативные или превентивные меры. Для целей настоящего изобретения, полезные и целевые клинические результаты, детектируемые либо не детектируемые, включают, в частности, облегчение симптомов, ослабление степени заболевания, стабилизированное состояние заболевания (т.е. без ухудшения), ослабление или замедление прогрессии заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссия (либо частичная, либо полная). «Лечение» также может обозначать продолжительное выживание по сравнению с ожидаемым выживанием при отсутствии получения лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет патологическое состояние или расстройство, а также тех, кто склонен к патологическому состоянию или расстройству, или тех, у кого следует предотвратить патологическое состояние или расстройство.

Ингибиторы митоза для интенсификации апоптоза при терапии

В настоящем изобретении предлагается ингибитор митоза для введения пациенту, имеющему патологические клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной ингибитором митоза, для интенсификации апоптоза клеток.

Введение ингибитора митоза в клетки вводит клетки в состояние задержки в митозе. Однако задержка в митозе необязательно приводит клетки к апоптозу или влечет за собой противоопухолевую эффективность (см., например: Shi, Jue, et al. "Cell Type Variation in Responses to Antimitotic Drugs that Target Microtubules and Kinesin-5." Cancer Research. 68(9) (May 1, 2008); pp.3269-76; и 2002 AACR Poster: "A Pharmacodynamic marker of mitosis demonstrates the anti-mitotic activity of SB-715992, an inhibitor of the mitotic kinesin KSP." www.cytokinetics.com/pdf/AACR_2002_Poster_1336.pdf). Было обнаружено, что перед пиковыми значениями апоптоза клетки должны оставаться в состоянии задержки в течение продолжительного периода времени (см. фигуру 1). Длительность периода времени, необходимого для апоптоза, является различной среди типов клеток и типов опухолей (см. фигуры 2 и 3). Также введение двух доз вместо одной увеличивает продолжительность биологического эффекта (см. фигуры 4 и 5), что, в случае ингибиторов митоза, увеличивает продолжительность и силу апоптоза (см. фигуры 6 и 7). Таким образом, поддержание клеток в состоянии задержки в течение подходящего эффективного периода времени необходимо для интенсификации апоптоза с использованием ингибитора митоза.

Введение ингибитора митоза к клеткам препятствует митозу. Например, введение ингибитора KSP увеличивает количество монополярных веретен. Однако для достижения биологического ответа должно добавляться минимальное количество ингибитора (см. фигуру 8). Таким образом, введение ингибитора митоза должно достигать биологически эффективной дозы ингибитора. Биологически эффективная доза ингибитора KSP представляет собой дозу ингибитора, которая в результате приводит к появлению блокированных монополярных веретен. Их можно наблюдать с помощью иммуногистохимических методов (см. фигуры 4, 5 и 8). Биологически эффективная доза других ингибиторов митоза в результате будет приводить к митотическим аберрациям, согласующимся с их целевым профилем.

Если введение ингибитора митоза не способно достичь биологически эффективной дозы, то подходящего биологического ответа не будет. Также, если введение ингибитора не способно поддерживать клетки в состоянии задержки достаточно долго, то клетки могут не уйти в апоптоз. Таким образом, для эффективной интенсификации апоптоза с использованием ингибитора митоза требуется введение ингибитора митоза, по меньшей мере, в биологически эффективной дозе для получения целевого биологического эффекта (т.е. задержка в митозе), а также ингибитор митоза должен находиться в дозированном состоянии в течение достаточно продолжительного периода времени, чтобы поддерживать клетки в состоянии задержки и для индукции апоптоза (см. фигуры 4-9 и 17-19).

Было обнаружено, что введение ингибитора митоза в виде дробной дозы, разбитой на два дня, может быть более эффективным, чем эта же целая доза, полученная в один день (см. фигуру 16).

Для опухолей, в которых клетки быстро входят в апоптоз после митотического блока (см. фигуру 3), задержки в митозе (см. фигуру 17) или апоптоза (см. фигуру 18), могут прямо не коррелировать с повышением эффективности ингибирования опухолевого роста при режиме дробной дозы (см. фигуру 16). В таких случаях меньшее количество клеток, наблюдаемых в состоянии задержки в митозе и апоптоза, может отражать быструю клеточную смерть, так что они более не детектируются в опухоли. Однако количество клеток с биполярным веретеном, указывающим на нормальный клеточный цикл в митозе, может коррелировать в обратной зависимости с повышенной эффективностью (см. фигуру 19). В таких случаях меньшее количество клеток с

биполярными веретенами указывает на более полный митотический блок с меньшим количеством клеток, выходящим из блока и вступающим в клеточный цикл.

В одном воплощении настоящего изобретения предлагается ингибитор митоза для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной ингибитором митоза, для интенсификации апоптоза клеток.

В другом воплощении настоящего изобретения предлагается '161 KSP-Ингибитор для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной '161 KSP-Ингибитором митоза, для интенсификации апоптоза клеток.

Настоящее изобретение относится к введению для интенсификации апоптоза ингибитора митоза, того же самого, что и вводимый для индукции задержки в митозе.

Настоящее изобретение применяется для обработки патогенных клеток, полученных клеточным делением или которые были обработаны путем ингибирования митоза. Ингибиторы митоза могут применяться для лечения различных заболеваний, включающих гиперпролиферативные заболевания и подагру. Гиперпрофилеративные заболевания включают злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание, артрит, отторжение трансплантата, воспалительное заболевание кишечника или пролиферацию, индуцированную после медицинского вмешательства.

В определенных воплощениях в изобретении предлагается интенсифицированный апоптоз для патогенных злокачественных клеток. Более конкретно, патогенные злокачественные клетки включают, но не ограничиваются перечисленным: злокачественные новообразования мягких тканей: саркому (ангиосаркому, фибросаркому, рабдомиосаркому, липосаркому), миксому, рабдомиому, фиброму, липому и тератому; легкие: бронхогенную карциному (плоскоклеточную, недифференцированную мелкоклеточную, недифференцированную крупноклеточную, аденокарциному), альвеолярную (бронхиальную) карциному, бронхиальную аденому, саркому, лимфому, хондроматозную гамартому, злокачественную мезотелиому; желудочно-кишечный тракт: для пищевода (плоскоклеточную карциному, аденокарциному, лейомиосаркому, лимфому), для желудка (карциному, лимфому, лейомиосаркому), для поджелудочной железы (дуктальную аденокарциному, инсулиному, глюкагоному, гастриному, карциноидные опухоли, випомы), для тонкой кишки (аденокарциному, лимфому, карциноидные опухоли, саркому Калоши, лейомиому, гемангиому, липому, нейрофиброму, фиброму), для толстой кишки (аденокарциному, тубулярную аденому, ворсинчатую аденому, гамартому, лейомиому); мочеполовой тракт: для почек (аденокарциному, опухоль Вильмса [нефробластома], лимфому, лейкоз), для мочевого пузыря и уретры (плоскоклеточную карциному, переходно-клеточную карциному, аденокарциному), для предстательной железы (аденокарциному, саркому), для яичка (семиному, тератому, эмбриональную карциному, тератокарциному, хориокарциному, саркому, кациному интерстициальных клеток, фиброму, фиброаденому, аденоматоидные опухоли, липому); печень: гепатому (печеночноклеточную карциному), холангиокарциному, гепатобластому, ангиосаркому, печеночноклеточную аденому, гемангиому; кости: остеогенную саркому (остеосаркому), фибросаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, хондросаркому, саркому Эвинга, злокачественную лимфому (ретикулосаркому), множественную миелому, злокачественную опухоль гигантских клеток - хордому, остеохондрому (костнохрящевые экзостозы), доброкачественную хондрому, хондробластому, хондромиксофиброму, остеоид-остеому и опухоли гигантских клеток; нервная система: для черепа (остеому, гемангиому, гранулому, ксантому, деформирующий остит), для мягких мозговых оболочек (менингиому, менингиосаркому, глиоматоз), для мозга (астроцитому,

медуллобластому, глиому, эпендимому, герминому [пинеалома], полиморфную глиобластому, олигодендроглиому, невриному, ретинобластому, врожденные опухоли, нейрофиброму спинного мозга, менингиому, глиому, саркому); гинекология: для матки (карциному эндометрия), для шейка матки (цервикальную карциному, предопухолевую цервикальную дисплазию), для яичников (карциному яичников [серозная цистаденокарцинома, слизеобразующая цистаденокарцинома неклассифицированная карцинома], гранулезотекаклеточные опухоли, опухоли клеток Сертоли-Лейдига, дисгерминому, злокачественную тератому), для вульвы (плоскоклеточную карциному, внутриэпителиальную карциному, аденокарциному, фибросаркому, меланому), для влагалища (светлоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, ботриоидную саркому [эмбриональную рабдомиосаркому], для фаллопиевых труб (карциному); гематология: для крови и костного мозга (миелоидный лейкоз [острый и хронический], острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, миелопролиферативные заболевания, множественную миелому, миелодиспластический синдром), болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому [злокачественную лимфому]; кожа: злокачественную меланому, базально-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, саркому Капоши, родинки - диспластические невоидные опухоли, липому, ангиому, дерамтофиброму, келоиды, псориаз; надпочечники: нейробластому. При использовании в настоящем документе термин «злокачественная клетка» включает клетку, пораженную любым из вышеописанных идентифицированных патологических состояний.

В определенных воплощениях, настоящее изобретение применяется для интенсификации апоптоза патогенных злокачественных клеток, где патогенные злокачественные клетки представляют собой клетки солидной опухоли. Клетки солидной опухоли включают, опухолевые клетки кожи, молочной железы, мозга, цервикальной карциномы, клетки тестикулярной карциномы и т.д. В определенных воплощениях, солидные опухоли выбраны из рака молочной железы, колоректального рака, немелкоклеточного рака легких, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака слюнной железы (аденоидный кистоз), рака пищевода, злокачественной мезотелиомы и смешанного мелкоклеточного рака легкого/немелкоклеточного рака легкого.

В определенных воплощениях, настоящее изобретение применяется для интенсификации апоптоза патогенных злокачественных клеток, где патогенные злокачественные клетки представляют собой опухолевые клетки крови. Опухолевые клетки крови включают клетки лимфомы, лейкоза, множественной миеломы и т.п. В определенных воплощениях, настоящее изобретение используется для интенсификации апоптоза патогенных злокачественных клеток, где патогенные злокачественные клетки выбраны из клеток лимфомы, лейкоза и клеток множественной миеломы. В следующем воплощении, настоящее изобретение применяется для интенсификации апоптоза патогенных злокачественных клеток, где патогенные злокачественные клетки представляют собой клетки прогрессирующего миелоидного лейкоза или рецидивирующей или не поддающейся лечению множественной миеломы. В следующем воплощении, настоящее изобретение применяется для интенсификации апоптоза патогенных злокачественных клеток, где патогенные злокачественные клетки представляют собой клетки рецидивирующей или не поддающейся лечению множественной миеломы.

Существует масса вариабельных параметров при поиске интенсифицированного апоптоза при введении ингибиторов митоза. Конкретно для ингибиторов митоза, для

того, чтобы достичь биологического эффекта, необходимо продолжать введение в течение достаточно продолжительного периода времени и при достаточном уровне экспонирования.

С целью индукции задержки в митозе в патогенных клетках осуществляют первое введение ингибитора митоза. Считается, что это первое введение происходит в первый день. Затем при осуществлении второго введения ингибитора митоза на второй или третий день может происходить интенсификация апоптоза. В ином случае вторую дозу вводят в интервале от 24 до 48 часов после введения первой дозы. Этот аспект настоящего изобретения дает возможность интенсификации апоптоза патогенных клеток, так как доза ингибитора достаточно высока для достижения биологически эффективной дозы для получения целевого биологического эффекта, т.е. клетки поддерживаются в состоянии задержки в митозе, а также задержка в митозе поддерживается достаточно долго для стимуляции апоптоза или выхода из митоза, что приводит к клеточной смерти.

Нет необходимости, чтобы время введения этой второй дозы точно соответствовало 24-48 часам после первой дозы. Это удобный способ обозначения того, что вторая доза должна вводиться через один или два дня после первой дозы. Таким образом, вторую дозу вводят приблизительно через 24-48 часов после первой дозы. Эта вторая доза может вводиться через 12-60 часов после первой дозы.

При введении второй дозы ингибитора митоза введение непосредственно друг за другом более удобно для пациентов. Предпочтительно иметь удобный режим дозирования для пациентов, чтобы повысить соблюдение пациентами метода лечения. Это особенно важно для терапевтических средств, которые вводят пациентам посредством внутривенной инъекции, поскольку дополнительные дозы могут требовать дополнительных визитов в больницу или к врачу для получения инъекции.

Известно много типов ингибиторов митоза, включающих алкалоиды барвинка, таксаны, эпотилоны, доластатин и аналоги доластатина, ингибиторы аврора-киназ, полоподобных киназ и митотического кинезина.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из алкалоидов барвинка, таксанов, эпотилонов, доластатина и аналогов доластатина, ингибиторы аврора-киназ, полоподобных киназ и митотического кинезина.

Ингибитором митоза может быть ингибитор митотического кинезина. Ингибитор митотического кинезина может быть ингибитором CENP-E или ингибитором KSP.

Ингибитором митоза может быть ингибитор KSP.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из GSK-295, испинесиба, '161 KSP-Ингибиторов, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085 и ARQ 621.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из испинесиба, '161 KSP-Ингибиторов, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085 и ARQ 621.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из испинесиба, '161 KSP-Ингибиторов и AZD-4877.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из '161 KSP-Ингибиторов. Ингибитором митоза может быть Соединение 1. Ингибитором митоза может быть Соединение 2. Ингибитором митоза может быть Соединение 3. Ингибитором митоза может быть Соединение 4. Ингибитором митоза может быть Соединение 5. Ингибитором митоза может быть Соединение 6.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из SU-6668, AZD-1 152,

CYC-116, AS-703569, MLN-8054, R763, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076, PHA-739385, MK-0457, MK-5108, ON-0191ONa, B1-2536, GSK-461364. испинесиба, '161 KSP-Ингибиторов, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085, ARQ 621 и GSK-295.

Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из винбластина, винкристина, виндезина, винорелбина, паклитаксела, доцетаксела, Абраксана®, колхицина, эпотилона A, эпотилона B, эпотилона D, иксабепилона, доластатина 10, доластатина 15, синтадотина, LU I 03793, цемадотина, SU-6668, AZD-1 152, CYC-116, AS-703569, MLN-8054, R763, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1 152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076, PHA-739385, MK-0457, MK-5108, ON-0I9IONa, B1-2536, GSK-461364, GSK-295, испинесиба, '161 KSP-Ингибиторов, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085, ARQ 621 и GSK-295.

Ингибитором митоза может быть алкалоид барвинка. Алкалоид барвинка может быть выбран из группы, состоящей из винбластина, винкристина, виндезина и винорелбина.

Ингибитором митоза может быть таксан. Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из паклитаксела, Абраксана® и доцетаксела.

Ингибитором митоза может быть колхицин.

Ингибитором митоза может быть эпотилон. Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из эпотилона A, эпотилона B, эпотилона D и иксабепилона.

Ингибитором митоза может быть доластатин или аналог доластатина. Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из доласатина 10, доласатина 15, сиинлиадотина, LU 103793 и цемадотина.

Ингибитором митоза может быть ингибитором аврора-киназ. Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из SU-6668, AZD-1152, CYC-116, AS-703569, MLN-8054, R763, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076, PHA-739385, MK-0457 или MK-5108.

Ингибиторами митоза могут быть ингибиторы полоподобных киназ. Ингибитор митоза может быть выбран из группы, состоящей из ON-OI910Na, BI-2536 и GSK-461364.

Ингибитором митоза может быть ингибитор CENP-E. Ингибитором митоза может быть GSK-295.

Как обсуждалось выше, подходящее количество ингибитора митоза должно вводиться с целью достижения целевого биологического эффекта. Таким образом, для интенсификации апоптоза путем введения, ингибитор митоза будет вводиться, по меньшей мере, в минимальном количестве, при котором достигается целевой биологический эффект, или в биологически эффективной дозе. Однако количество не должно быть настолько высоким, чтобы перевешивать пользу от биологического эффекта над неприемлемыми побочными эффектами. Таким образом, для интенсификации апоптоза путем введения ингибитора митоза будет вводиться не более чем максимальная переносимая доза («МПД»). Каждое введение ингибитора митоза регулируется между биологически эффективной дозой и максимально допустимой дозой.

Максимально допустимую дозу определяют как наибольшую дозу, которая производит приемлемую частоту возникновения дозолимитирующей токсичности («ДЛТ»). Дозы, которые вызывают неприемлемую частоту ДЛТ, предполагаются недопустимыми. Как правило, МПД для конкретного режима устанавливается в фазе 1 клинических испытаний. Они, как правило, проводятся на пациентах, начиная с безопасной стартовой дозы, составляющей 1/10 от сильной токсичной дозы («STD10»)

у грызунов (на основе мг/м^2), и, разделяя пациентов на группы по три, повышают дозу согласно модифицированной последовательности Фибоначчи, при которой более высокие стадии зокалации имеют уменьшающиеся относительные инкременты (например, доза увеличивается на 100%, 65%, 50%, 40%, а после этого на 30-35%). Повышение дозы продолжается в группах по три пациента до тех пор, пока не будет достигнута непереносимая доза. Предполагается, что следующий более низкий уровень дозы, которая дает приемлемую частоту ДЛТ, является МПД.

Также МПД ингибитора митоза варьируется в зависимости от ингибитора, образца, состава и режима дозирования. Например, введение ингибитора митоза только в один день по сравнению с введением в течение одного и двух дней, по сравнению с введением в течение от одного до трех и вплоть до семи, четырнадцати, двадцати одного или двадцати пяти, может иметь различные МПД. Однако, как обсуждалось выше, интенсификация апоптоза с использованием ингибитора митоза для того, чтобы оно было биологически эффективным, требует введения ингибитора в достаточно большом количестве, а также требует достаточно продолжительного времени, чтобы поддерживать клетки в состоянии митотического блока. Введением в один день можно достичь только биологически эффективной дозы, но оно может быть недостаточно продолжительным для интенсификации апоптоза клеток. В ином случае, введение ингибитора митоза в течение от одного до трех дней может быть достаточно продолжительным, но его может быть недостаточно для достижения биологически эффективной дозы, и таким образом, апоптоз не будет интенсифицирован. Это может быть связано с тем, что МПД трехдневного дозирования ниже, чем биологически эффективная доза.

Как правило, при обработке патогенных клеток, таких как злокачественные новообразования, конкретное соединение в МПД вводят пациенту так, чтобы достигалась максимальная польза от лечения. Соответственно, в одном воплощении настоящего изобретения предлагается ингибитор митоза для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной ингибитором митоза, для интенсификации апоптоза клеток, где ингибитор митоза вводят в максимальной переносимой дозе.

В другом воплощении настоящего изобретения предлагаются '161 KSP-Ингибиторы для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной '161 KSP-Ингибиторами, для интенсификации апоптоза клеток, где '161-Ингибитор вводят в максимальной переносимой дозе.

При обработке патогенных клеток, таких как злокачественные новообразования, цикл дозирования устанавливается таким образом, чтобы после завершения первого цикла могли вводиться дополнительные циклы до тех пор, пока такая обработка не будет более необходима или эффективна. Один из факторов, определяющих длину цикла, заключается в возможности восстановления после побочных эффектов или в уменьшении побочных эффектов. После введения фармацевтической композиции или терапевтического средства, конкретно ингибитора митоза, пациенты могут испытывать побочные эффекты. В зависимости от типа побочных эффектов может быть необходимо восстановление после побочных эффектов или уменьшение побочных эффектов. Это восстановление после побочных эффектов или уменьшение побочных эффектов может занимать время, которое, в свою очередь, может контролировать длину цикла перед началом второго цикла.

Одним из побочных эффектов ингибиторов митоза, а конкретно, ингибиторов KSP, является острая нейтропения. Нейтропения представляет собой гематологическое

расстройство, характеризующееся аномально низким количеством нейтрофильных гранулоцитов типа лейкоцитов. Как правило, пациенты, испытавшие такой тип побочных эффектов в результате действия ингибитора митоза (или ингибитора KSP), с ходом времени восстанавливаются от побочных эффектов нейтропении в отсутствие дополнительных доз ингибитора.

После однократного введения ингибитора KSP многие пациенты восстанавливаются после побочных эффектов или побочные эффекты уменьшаются на 14-21 день цикла.

В настоящем изобретении предлагается ингибитор митоза для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной ингибитором митоза, для интенсификации апоптоза клеток, где в цикле задана возможность для восстановления после побочных эффектов или для уменьшения побочных эффектов.

Первая доза индуцирует задержку в митозе. В настоящем изобретении предлагается интенсификация апоптоза с помощью второй дозы, вводимой через один или два дня после первой дозы. В настоящем изобретении предполагается, что цикл, включающий введение первой и второй дозы, составляет 14-21 день. Это удобный способ обозначения 2-3 недель, и нет необходимости в том, чтобы было точно 14-21 день. Таким образом, цикл приблизительно составляет 14-21 день. Цикл может составлять от 11 до 24 дней. Цикл может составлять 14 дней или 11-17 дней. Цикл также может составлять 21 день или 18-24 дня.

В другом воплощении настоящего изобретения предлагается '161 KSP-Ингибитор для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной '161 KSP-Ингибитором, для интенсификации апоптоза клеток. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 1. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 2. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 3. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 4. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 5. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 6. В определенных воплощениях патогенные клетки представляют собой клетки злокачественного новообразования. В определенных воплощениях патогенные клетки представляют собой опухолевые клетки крови. В определенных воплощениях патогенные клетки выбраны из клеток лимфомы, лейкоза и клеток множественной миеломы. В определенных воплощениях патогенные клетки представляют собой клетки солидной опухоли. В определенных воплощениях патогенные клетки выбраны из опухолевых клеток кожи, молочной железы, мозга, цервикальной карциномы и клеток тестикулярной карциномы. В определенных воплощениях клетки солидной опухоли выбраны из клеток рака молочной железы, колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака слюнной железы (аденоидного кистозного), рака пищевода, злокачественной мезотелиомы и смешанного мелкоклеточного рака легкого/немелкоклеточного рака легкого. В определенных воплощениях ингибитор дозируют в максимальной переносимой дозе.

В другом воплощении настоящего изобретения предлагается '161 KSP-Ингибитор для введения пациенту, имеющему патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной '161 KSP-Ингибитором, для интенсификации апоптоза клеток, где Ингибитор вводят в максимальной переносимой дозе. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 1. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 2. В определенных воплощениях

'161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 3. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 4. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 5. В определенных воплощениях '161 KSP-Ингибитор представляет собой Соединение 6. В определенных воплощениях патогенные клетки представляют собой клетки злокачественного новообразования. В определенных воплощениях патогенные клетки представляют собой опухолевые клетки крови. В определенных воплощениях патогенные клетки выбраны из клеток лимфомы, лейкоза и клеток множественной миеломы. В определенных воплощениях патогенные клетки представляют собой клетки солидной опухоли. В определенных воплощениях патогенные клетки выбраны из опухолевых клеток кожи, молочной железы, мозга, цервикальной карциномы и клеток тестикулярной карциномы. В определенных воплощениях клетки солидной опухоли выбраны из клеток рака молочной железы, колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака слюнной железы (аденоидного кистозного), рака пищевода, злокачественной мезотелиомы и смешанного мелкоклеточного рака легкого/немелкоклеточного рака легкого. В определенных воплощениях Ингибитор дозируют в максимальной переносимой дозе.

Примеры

С целью иллюстрации изобретения включены следующие примеры. Однако понятно, что эти примеры не ограничивают изобретение и предназначены исключительно для поддержки и предложения способа практического осуществления изобретения.

Пример 1

Нейтрализация апоптоза

Клетки HT-29, обработанные либо контролем с носителем (ДМСО), либо 10 нМ Соединения 4, рассевали в идентичные 96-луночные культуральные планшеты. Через 8 или 24 часа Соединение 4 удаляли от клеток HT-29 и среду заменяли на свежую ростовую среду с целью определения нейтрализации индукции апоптоза. Измеряли активность Каспазы 3/7 в виде люминесценции продукта реакции в указанные моменты времени с использованием реагента «CaspaseGlo 3/7» (Promega) и люминометра. Значения представлены в виде активности каспазы 3/7 в клетках, обработанных Соединением 4, разделенной на активность каспазы 3/7 в клетках, обработанных ДМСО. Результаты представлены на фигуре 1.

Пример 2

Апоптоз в HT-29 после продолжительной обработки с помощью Соединения 4

Клетки HT-29, продолжительно обработанные или контролем с носителем (ДМСО), или Соединением 4 в концентрациях 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ, высевали в идентичные 96-луночные культуральные планшеты. Измеряли активность Каспазы 3/7 в виде люминесценции продукта реакции в указанные моменты времени с использованием реагента «CaspaseGlo 3/7» (Promega) и люминометра. Значения представлены в виде активности каспазы 3/7 в клетках, обработанных Соединением 4, разделенной на активность каспазы 3/7 в клетках, обработанных ДМСО. Данные включают в себя среднее значение и величины стандартного отклонения четырех независимых экспериментов. Результаты представлены на фигуре 2.

Пример 3

Апотоз в клетках RPMI 8226

Клетки RPMI 8226, обработанные либо контролем с носителем (ДМСО), либо 10 нМ Соединением 4, либо 10 нМ винкристином, высевали в идентичные 96-луночные культуральные планшеты. Измеряли активность Каспазы 3/7 в виде люминесценции

продукта реакции в указанные моменты времени с использованием реагента «Caspase-Glo 3/7» (Promega) и люминометра. Значения представлены в виде активности каспазы 3/7 в клетках, обработанных лекарственным средством, разделенной на активность каспазы 3/7 в клетках, обработанных ДМСО. Данные включают в себя среднее значение и величины стандартного отклонения четырех независимых экспериментов. Результаты представлены на фигуре 3.

Пример 4

Продолжительность существования монополярных веретен и величина апоптоза (ксенотрансплантаты HT-29)

Самкам голых мышей подкожно имплантировали 5×10^6 клеток HT-29 в 100 мкл PBS. Через десять дней измеряли опухоли и мышей разделяли на три группы случайным образом со средним размером опухоли в каждой группе, составляющим приблизительно 240 $мм^3$. Соединение 4 растворяли в нормальном солевом растворе сразу перед введением дозы. Было определено, что МПД для Соединения 4 составляет 20 мг/кг. Объем дозы составил 10 мл/кг. Вводили контроль с носителем в первый день; Соединение 4 в концентрации 20 мг/кг в первый день и 20 мг/кг Соединения 4 в дни 1 и 3. В различные моменты времени после введения дозы (24, 48, 72, 96, 120 и 144 часа) мышей подвергали эвтаназии с помощью CO_2-ингаляции, а опухоли изолировали и немедленно помещали в формалин. Образцы группы, получавшей пустой контроль, собирали через 24 и 72 часа после введения дозы. Образцы группы, получавших соединение в день 1, собирали через 24, 48, 72 и 96 часов после введения дозы. Образцы группы, получавшей соединение в дни 1 и 3, собирали через 72, 96, 120 и 144 часов после введения первой дозы. Парафиновые блоки опухолевой ткани готовили с помощью стандартных процедур. Визуализацию монополярных веретен проводили путем окрашивания срезов с помощью первичного человеческого антитела к альфа-тубулину (клон B-7, Santa Cruz Biotechnology) с последующей обработкой вторичным козьим антителом, связывающим мышиные антитела, конъюгированным с Alexafluor 488 (Invitrogen). Для подсчета клеток окрашивали ядра с помощью Hoechst 33342. Структуры веретена подсчитывали вручную в трех областях 40X увеличения для каждого образца с использованием флуоресцентного микроскопа. Апоптоз оценивали количественно с помощью ручного подсчета TUNEL-положительных клеток, также в трех областях 40X увеличения для каждого образца (TUNEL-окрашивание проводили с использованием набора «In Situ Cell Death Detection Kit, AP» от Roche). Результаты представлены на фигурах 4 и 6.

Пример 5

Продолжительность существования монополярных веретен и величина апоптоза (ксенотрансплантаты из HT-29)

Способы примера 5 являются теми же, что и в примере 4, за исключением того, что вводили контроль с носителем в день 1; Соединение 4 в концентрации 8 мг/кг в день 1 и 8 мг/кг Соединения 4 в дни 1 и 3. Образцы группы, получавшей контроль с носителем, собирали через 24 и 72 часа после введения дозы. Образцы группы, получавших соединение в день 1, собирали через 24, 48, 72 и 96 часов после введения дозы. Образцы группы, получавшей соединение в день 1 и день 3, собирали через 72, 96, 120 и 144 часа после введения первой дозы. Результаты представлены на фигурах 5 и 7.

Пример 6

Митотический блок и апоптоз (HT-29)

Самкам голых мышей подкожно имплантировали 3×10^6 клеток HT-29 в 100 мкл PBS. Через четырнадцать дней измеряли опухоли и мышей разделяли на три группы

случайным образом со средним размером опухоли в каждой группе, составляющим приблизительно 300 мм^3. Вводили контроль с носителем и Соединение 4 в концентрации 5, 10, 20 и 30 мг/кг. Все образцы собирали через 24 и 48 часов после введения дозы. Все остальные способы были описаны в примере 4. Результаты представлены на фигурах 8 и 9.

Пример 7

Ингибирование опухолевого роста при различных режимах дозирования (HT-29)

Самкам голых мышей подкожно имплантировали 4×10^6 клеток HT-29 в 100 мкл PBS. Через тринадцать дней измеряли опухоли и мышей разделяли на восемь групп случайным образом со средним размером опухоли в каждой группе, составляющим приблизительно 210 мм^3. Соединение 4 растворяли в нормальном солевом растворе сразу перед введением и вводили интраперитонеально в количестве 10 мл/кг в течение 12 дней в дозах 4 мг/кг каждый день, 8 мг/кг через день и 16 мг/кг каждый четвертый день. Массу животных и размер опухолей измеряли (с помощью электронного штангенциркуля) дважды в неделю. Объем опухоли рассчитывали с помощью формулы: объем = (ширина^2 × длина)/2. Результаты представлены на фигуре 10.

Пример 8

Ингибирование опухолевого роста при различных режимах дозирования (HT-29)

Самкам голых мышей подкожно имплантировали 5×10^6 клеток HT-29 в 100 мкл PBS. Через одиннадцать-четырнадцать дней измеряли опухоли и мышей разделяли на семь групп случайным образом со средним размером опухоли в каждой группе, составляющим приблизительно 230 мм^3. Соединение 4 растворяли в нормальном солевом растворе сразу перед дозированием и вводили интраперитонеально в количестве 10 мл/кг. Схема дозировок была следующей: пустой носитель в день 1 и день 2; и Соединение 4 в концентрации 20 мг/кг в день 1; 20 мг/кг в дни 1 и 2; 20 мг/кг в дни 1 и 3; 5 мг/кг в дни 1, 2 и 3; 10 мг/кг в дни 1, 2 и 3; 10 мг/кг в дни 1, 2, 3, 4 и 5; 10 мг/кг в дни 1 и 2 и 10 мг/кг в дни 1 и 3. Массу животных и размер опухолей измеряли (с помощью электронного штангенциркуля) дважды в неделю. Объем опухоли рассчитывали с помощью формулы: объем = (ширина^2 × длина)/2. Доза 10 мг/кг в дни 1, 2, 3, 4 и 5 была непереносимой (более чем 20% потери веса и/или смерть некоторых из мышей). Результаты представлены на фигурах 11-15.

Пример 9

Ингибирование опухолевого роста при различных режимах дозирования (RPMI 8226)

Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 1×10^7 клеток RPMI 8226 в 100 мкл PBS вместе с 50% «Matrigel». Через двадцать пять дней измеряли опухоли и мышей разделяли на семь групп случайным образом со средним размером опухоли в каждой группе, составляющим приблизительно 225 мм^3. Соединение 4 растворяли в физиологическом растворе сразу перед введением и вводили интраперитонеально в количестве 10 мл/кг. Схема дозировок была следующей: пустой носитель в день 1 и Соединение 4 в концентрации 20 мг/кг в день 1; 10 мг/кг в дни 1 и 2; 10 мг/кг в дни 1 и 3 и 20 мг/кг в дни 1, 5 и 9. Массу животных и размер опухолей измеряли (с помощью электронного штангенциркуля) дважды в неделю. Объем опухоли рассчитывали с помощью формулы: объем = (ширина^2 × длина)/2. Результаты представлены на фигуре 16.

Пример 10

Продолжительность существования монополярных веретен, биполярных веретен и величина апоптоза (RPMI 8226)

Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 1×10^7 клеток RPMI 8226 в 100 мкл PBS вместе с 50% «Matrigel». Через тридцать один день измеряли опухоли, и мышей разделяли на три группы случайным образом со средним размером опухоли в каждой группе, составляющим приблизительно 210 $мм^3$. Соединение 4 растворяли в физиологическом растворе сразу перед введением. Было определено, что МПД для Соединения 4 составлят 20 мг/кг. Объем дозы составил 10 мл/кг. Схема дозировок была следующей: с пустым контролем в день 1; с Соединением 4 в концентрации 10 мг/кг в день 1; 20 мг/кг в день 1; 10 мг/кг в дни 1 и 2 и 10 мг/кг в дни 1 и 3. В различные моменты времени после введения доз (24, 48, 72 и 96 часов) мышей подвергали эвтаназии с помощью CO_2-ингаляции, а опухоли изолировали и немедленно помещали в формалин. Образцы группы, получавшей контроль с носителем, собирали через 48 часов после введения доз. Образцы группы, получавшей 10 мг/кг в день 1, собирали через 24 и 48 часов после введения доз. Образцы группы, получавшей 20 мг/кг в день 1, собирали через 24, 48 и 72 часа введения доз. Образцы группы, получавшей 10 мг/кг в дни 1 и 2, собирали через 48 и 72 часа после введения первой дозы. Образцы группы, получавшей 10 мг/кг в дни 1 и 3, собирали через 72 и 96 часов после введения первой дозы. Парафиновые блоки опухолевой ткани готовили с помощью стандартных процедур. Визуализацию монополярных веретен проводили путем окрашивания срезов с помощью первичного человеческого антитела к альфа-тубулину (клон B-7, Santa Cruz Biotechnology) с последующей обработкой вторичным козьим антителом, связывающим мышиные антитела, конъюгированным с Alexafluor 488 (Invitrogen). Для подсчета клеток ядра окрашивали с помощью Hoechst 33342. Структуры веретена подсчитывали вручную в трех областях 40X увеличения для каждого образца с использованием флуоресцентного микроскопа. Апоптоз оценивали количественно с помощью ручного подсчета TUNEL-положительных клеток, также в трех областях 40X увеличения для каждого образца (TUNEL-окрашивание проводили с использованием набора «In Situ Cell Death Detection Kit, AP» от Roche). Результаты представлены на фигурах 17, 18 и 19.

Пример 11

Определение МПД в Исследовании Фазы 1

В клиническое испытание фазы 1 на человеке было вовлечено всего 13 пациентов с различными солидными опухолями и со средним возрастом 66 лет (в интервале 40-79 лет) (см. "Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of ARRY-520 in Solid Tumors." http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00462358). Обрабатываемые солидные опухоли представляли собой рак молочной железы (2), колоректальный рак (2), немелкоклеточный рак легкого (2), рак поджелудочной железы (2), рак мочевого пузыря, рак слюнной железы (аденоидный кистозный), рак пищевода, злокачественную мезотелиому и смешанный мелкоклеточный рак легкого/немелкоклеточный рак легкого. Для введения Соединение 4 было предоставлено в виде лиофилизованного порошка, находящегося в чистой стеклянной пробирке Типа 1, для в/в использования. Количество вводимой дозы составило 1,25 и 1,6 мг/$м^2$/день Соединения 4 в дни 1 и 2 каждые две недели. Определили, что МПД составляет 1,25 мг/$м^2$/день (кумулятивная доза за цикл составляет 2,5 мг/$м^2$), с ДЛТ гипонатриемии стадии 3, с анорексией, увеличением AST и лихорадочной нейтропенией.

См. также "A Phase 1/2 Study of ARRY-520 in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma." http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00821249.

В то время как изобретение будет описано совместно с пронумерованными воплощениями, понятно, что они не предназначены для ограничения изобретения. Напротив, изобретение предназначено для того, чтобы охватить все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в рамки настоящего изобретения, определенного пунктами формулы изобретения. Таким образом, вышеизложенное описание предлагается исключительно в качестве иллюстрации принципов изобретения.

Слова «содержит», «содержащий», «включает» и «включающий» при использовании в настоящем описании и в последующей формуле изобретения предназначены для определения присутствия установленных признаков, чисел, компонентов или стадий, но это не исключает присутствия или дополнения одного или более из других признаков, чисел, компонентов, стадий или их групп.

Формула изобретения

1. Применение соединения (S)-2-(3-аминопропил)-5-(2,5-дифторфенил)-N-метокси-N-метил-2-фенил-1,3,4-тиадиазол-3(2H)-карбоксамида в максимально переносимой дозе для интенсификации после ее введения процесса апоптоза клеток у пациента, имеющего патогенные клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной этим же соединением.

2. Применение по п.1, при котором патогенными клетками являются клетки злокачественного новообразования.

3. Применение по п.1, при котором патогенными клетками являются опухолевые клетки крови.

4. Применение по п.1, при котором патогенные клетки выбраны из клеток лимфомы, лейкоза и клеток множественной миеломы.

5. Применение по п.1, при котором патогенными клетками являются клетки солидной опухоли.

6. Применение по п.1, при котором патогенные клетки выбраны из опухолевых клеток кожи, молочной железы, мозга, цервикальной карциномы и клеток тестикулярной карциномы.

7. Применение по п.1, при котором патогенные клетки выбраны из клеток рака молочной железы, колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака слюнной железы (аденоидного кистозного), рака пищевода, злокачественной мезотелиомы и смешанного мелкоклеточного рака легкого/немелкоклеточного рака легкого.

8. Применение по любому из пп.1-7, при котором введение приходится на 11-17 день цикла.

9. Применение по п.8, при котором первая доза соединения обеспечивает клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной этим соединением, вводится в первый день, а вторая доза, вызывающая интенсификацию процесса апоптоза клеток, вводится на второй день.

10. Применение по п.9, при котором максимальная переносимая доза составляет 1,25 мг/м^2/сутки.

11. Применение по п.8, при котором первая доза соединения обеспечивает клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной этим соединением, вводится в первый день, а вторая доза, вызывающая интенсификацию процесса апоптоза клеток, вводится на третий день.

12. Применение по п.11, при котором максимальная переносимая доза составляет

1,25 мг/м^2/сутки.

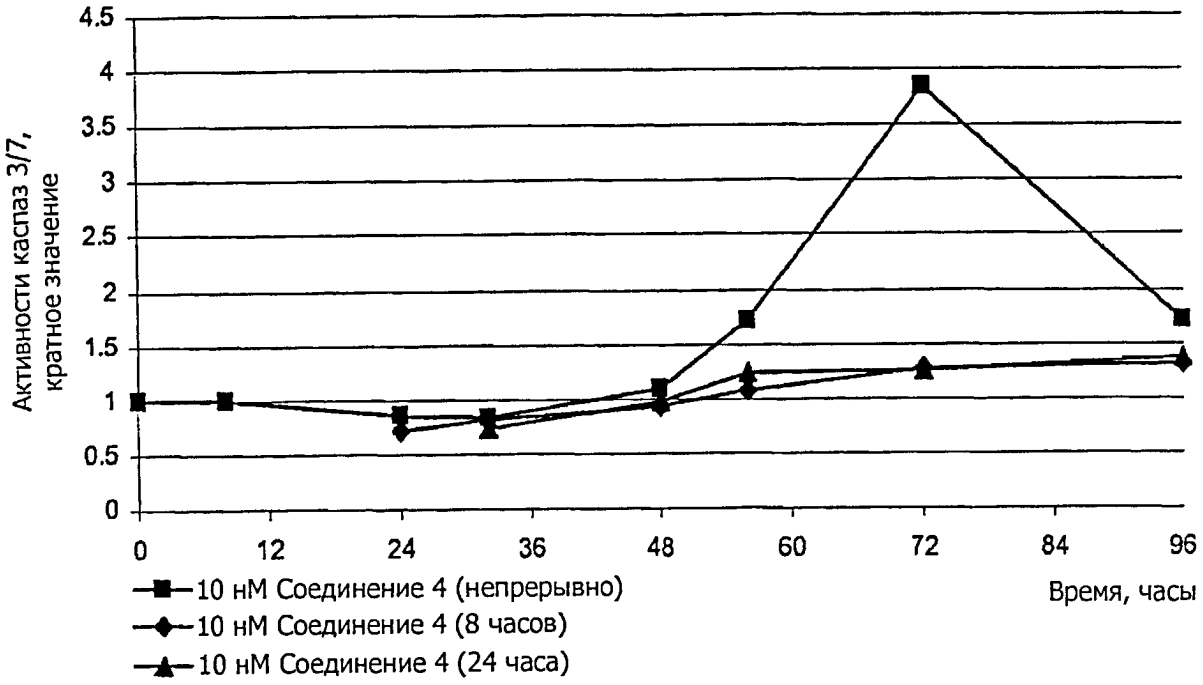
13. Применение по любому из п.1-7, при котором введение приходится на 18-24 день цикла.

14. Применение по п.13, при котором первая доза соединения обеспечивает клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной этим соединением, вводится в первый день, а вторая доза, вызывающая интенсификацию процесса апоптоза клеток, вводится на второй день.

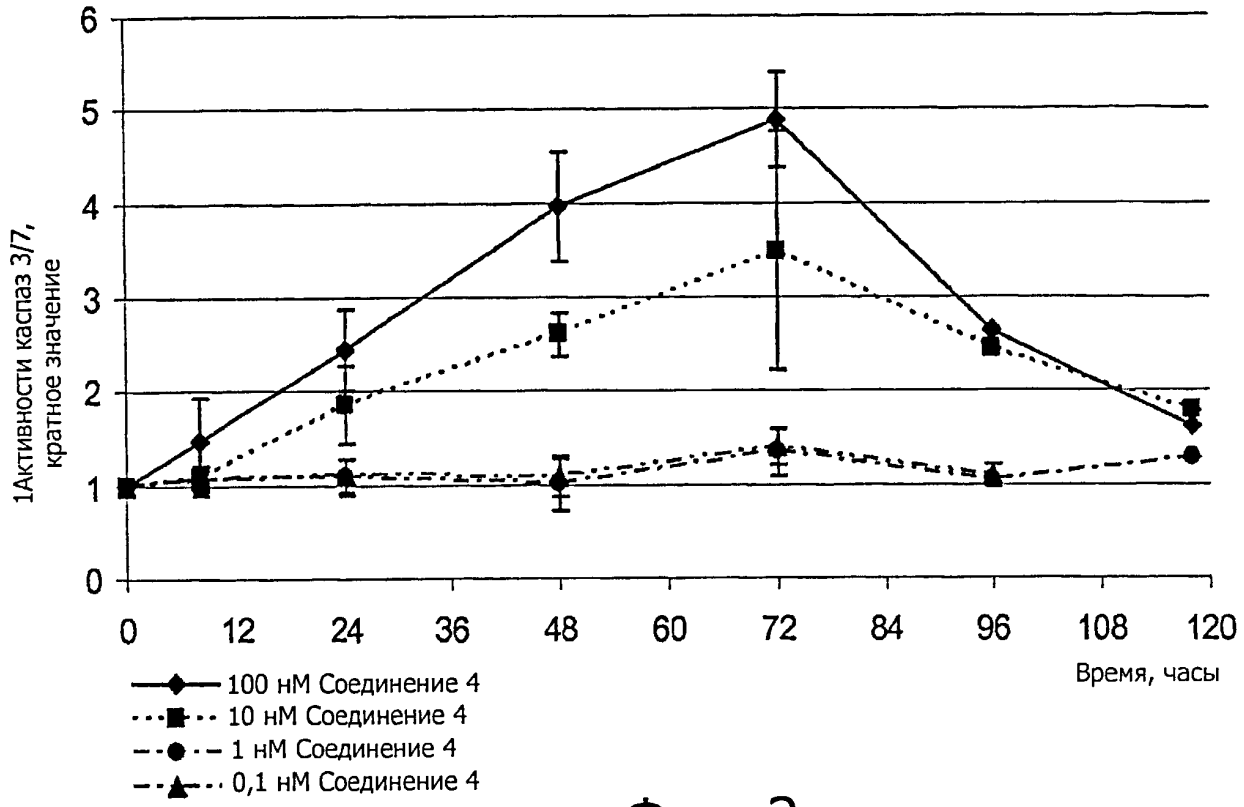
15. Применение по п.14, при котором максимальная переносимая доза составляет 1,25 мг/м^2/сутки.

16. Применение по п.13, при котором первая доза соединения обеспечивает клетки в состоянии задержки в митозе, индуцированной этим соединением, вводится в первый день, а вторая доза, вызывающая интенсификацию процесса апоптоза клеток, вводится на третий день.

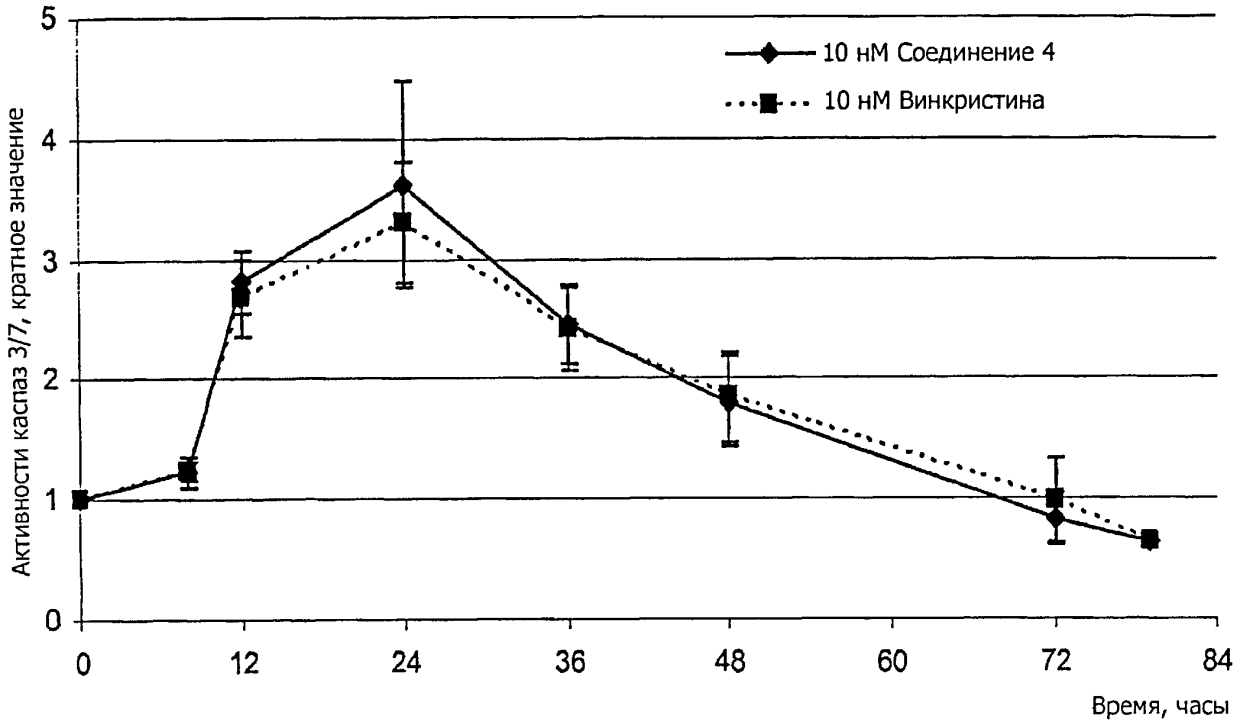
17. Применение по п.16, при котором максимальная переносимая доза составляет 1,25 мг/м^2/сутки.


Активности каспаз 3/7, кратное значение
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
12
24
36
48
60
72
84
96
Время, часы
10 нМ Соединение 4 (непрерывно)
10 нМ Соединение 4 (8 часов)
10 нМ Соединение 4 (24 часа)

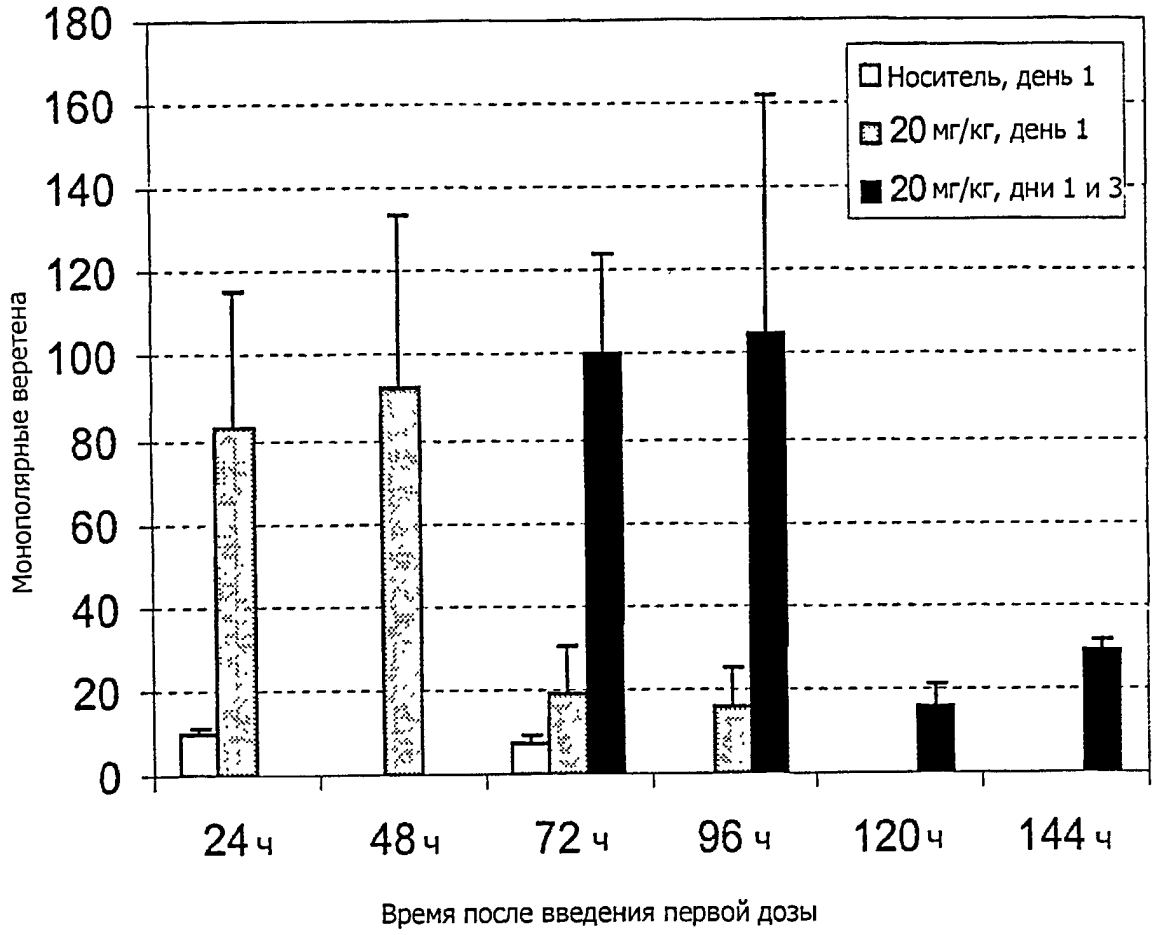
Фиг. 1


1Активности каспаз 3/7, кратное значение
6
5
4
3
2
1
0
0
12
24
36
48
60
72
84
96
108
120
Время, часы
100 нМ Соединение 4
10 нМ Соединение 4
1 нМ Соединение 4
0,1 нМ Соединение 4

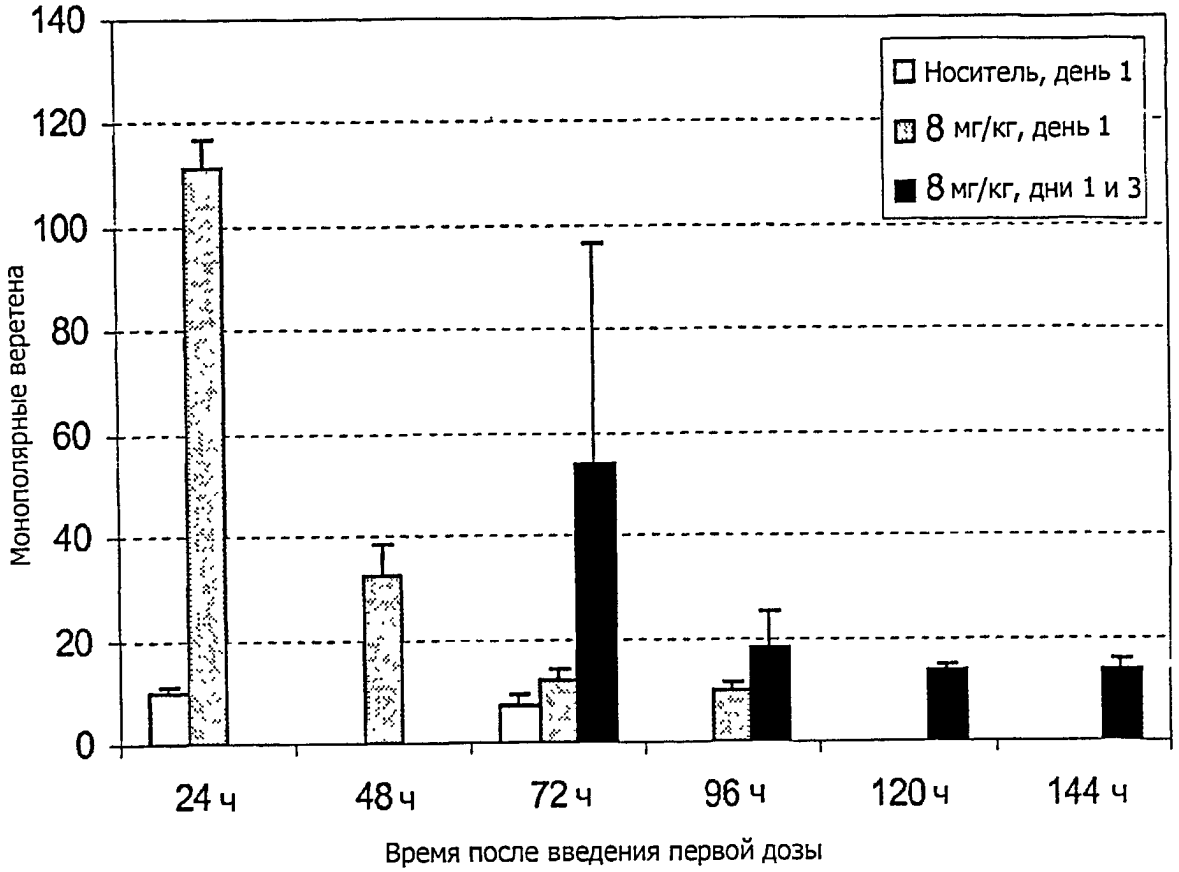
Фиг. 2


10 нМ Соединение 4
10 нМ Винкристина
Активности каспаз 3/7, кратное значение
0
1
2
3
4
5
0
12
24
36
48
60
72
84
Время, часы

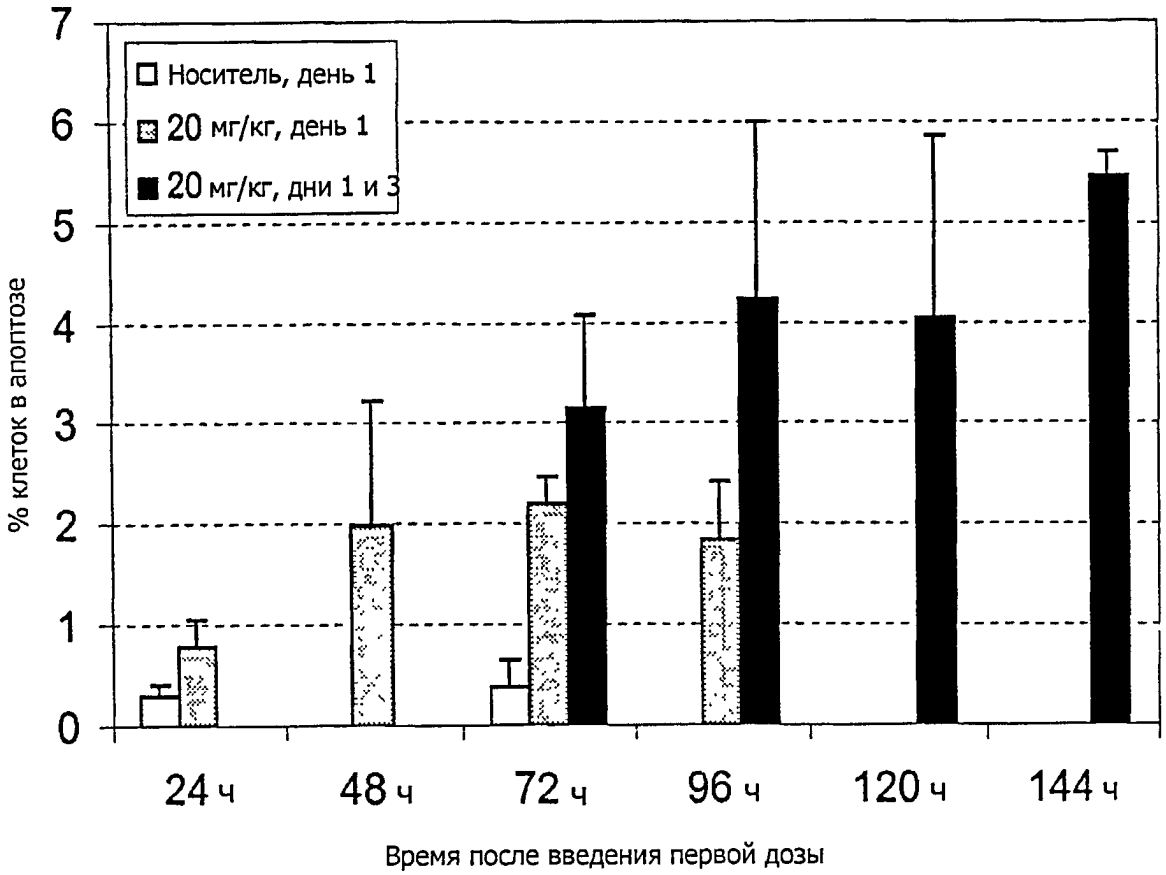
Фиг. 3


Носитель, день 1
20 мг/кг, день 1
20 мг/кг, дни 1 и 3
Монополярные веретена
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
120 ч
144 ч
Время после введения первой дозы

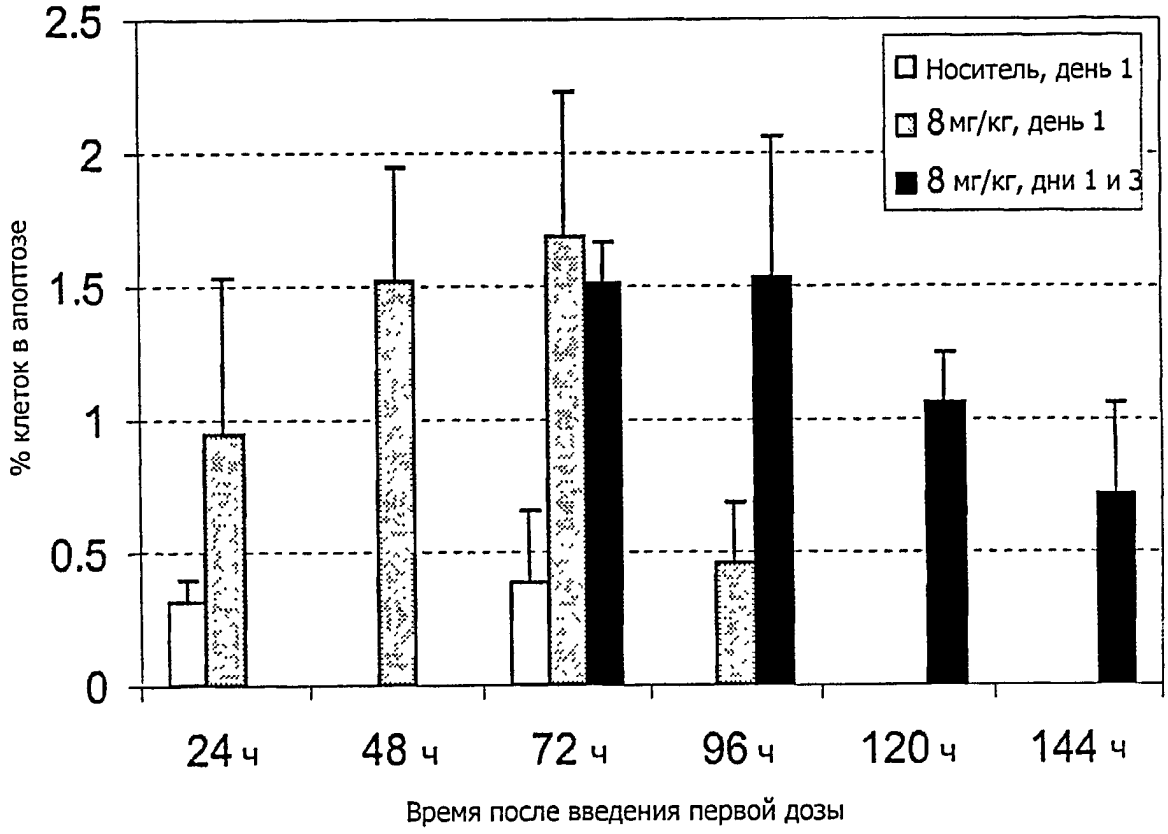
Фиг. 4


140
120
100
80
60
40
20
0
Монополярные веретена
Носитель, день 1
8 мг/кг, день 1
8 мг/кг, дни 1 и 3
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
120 ч
144 ч
Время после введения первой дозы

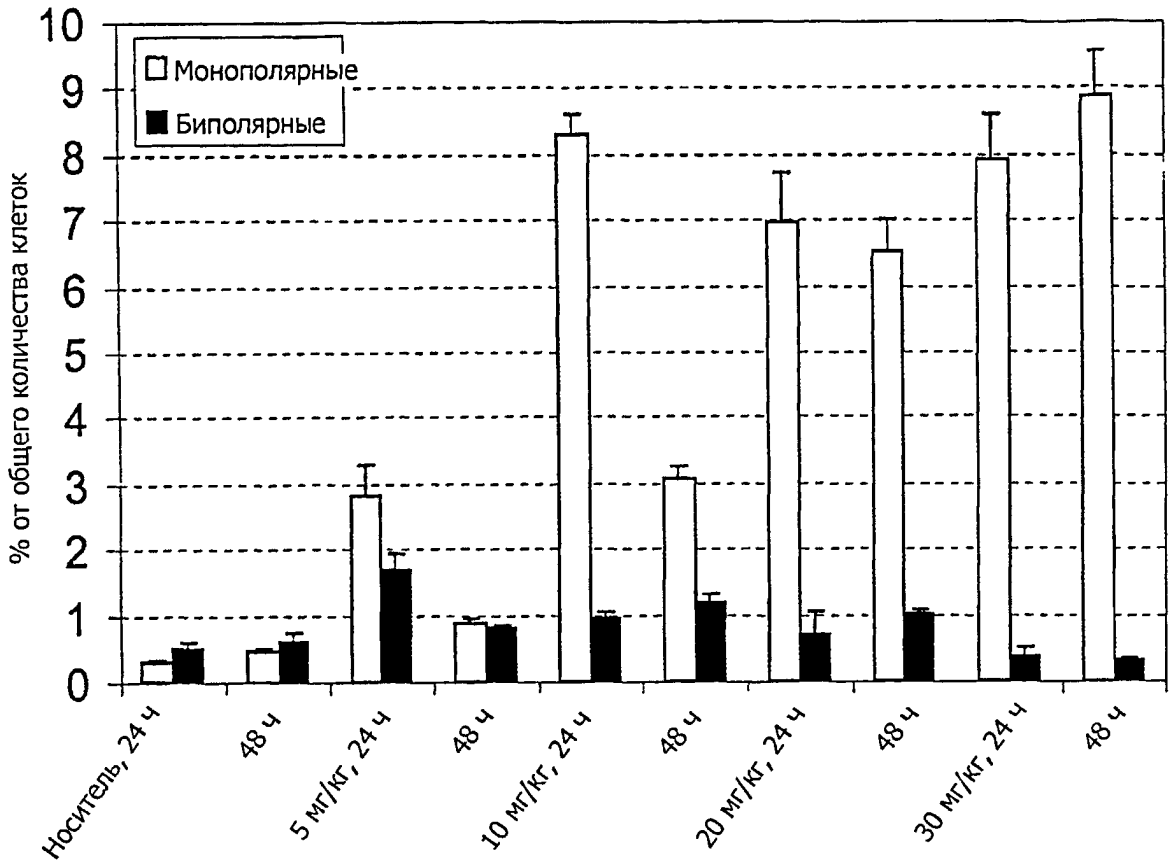
Фиг. 5


Носитель, день 1
20 мг/кг, день 1
20 мг/кг, дни 1 и 3
% клеток в апоптозе
0
1
2
3
4
5
6
7
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
120 ч
144 ч
Время после введения первой дозы

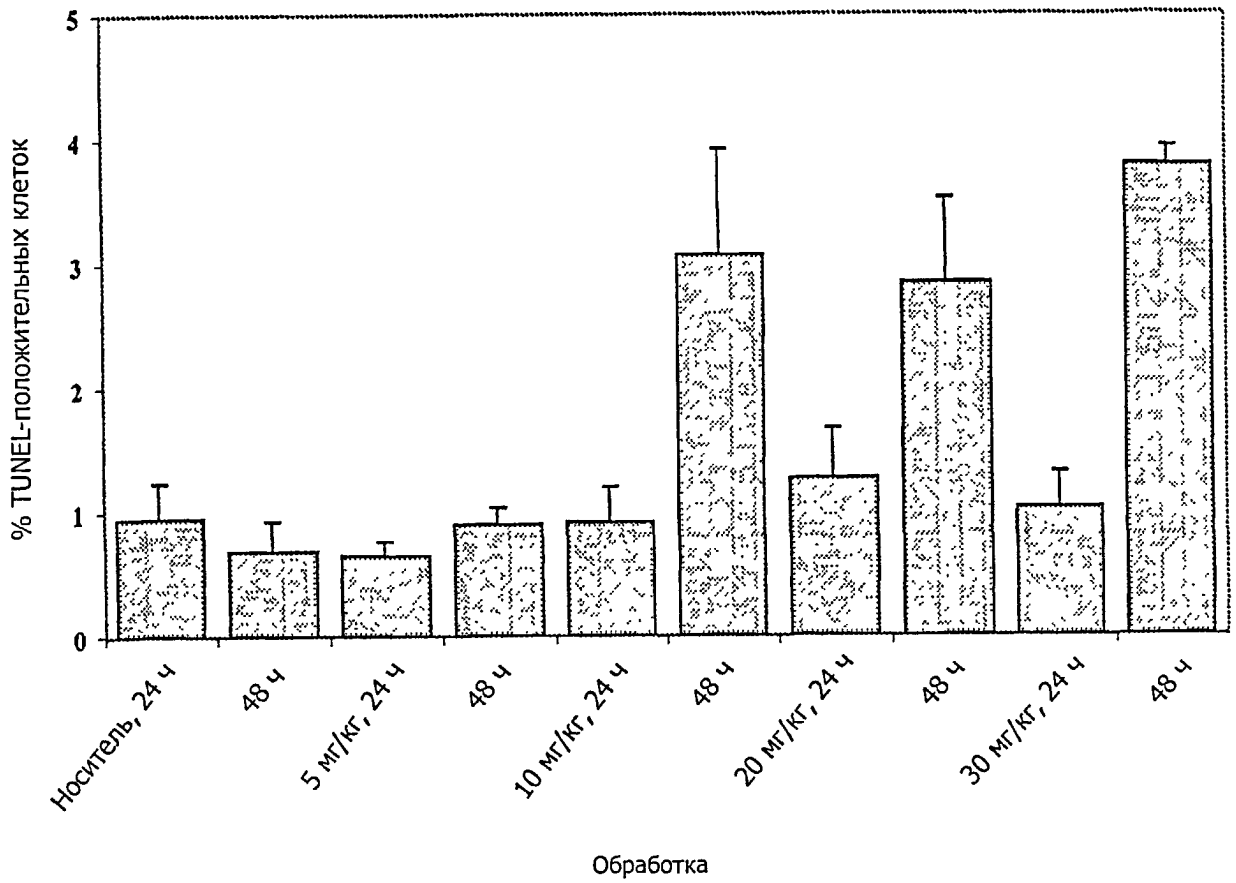
Фиг. 6


Носитель, день 1
8 мг/кг, день 1
8 мг/кг, дни 1 и 3
% клеток в апоптозе
0
0.5
1
1.5
2
2.5
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
120 ч
144 ч
Время после введения первой дозы

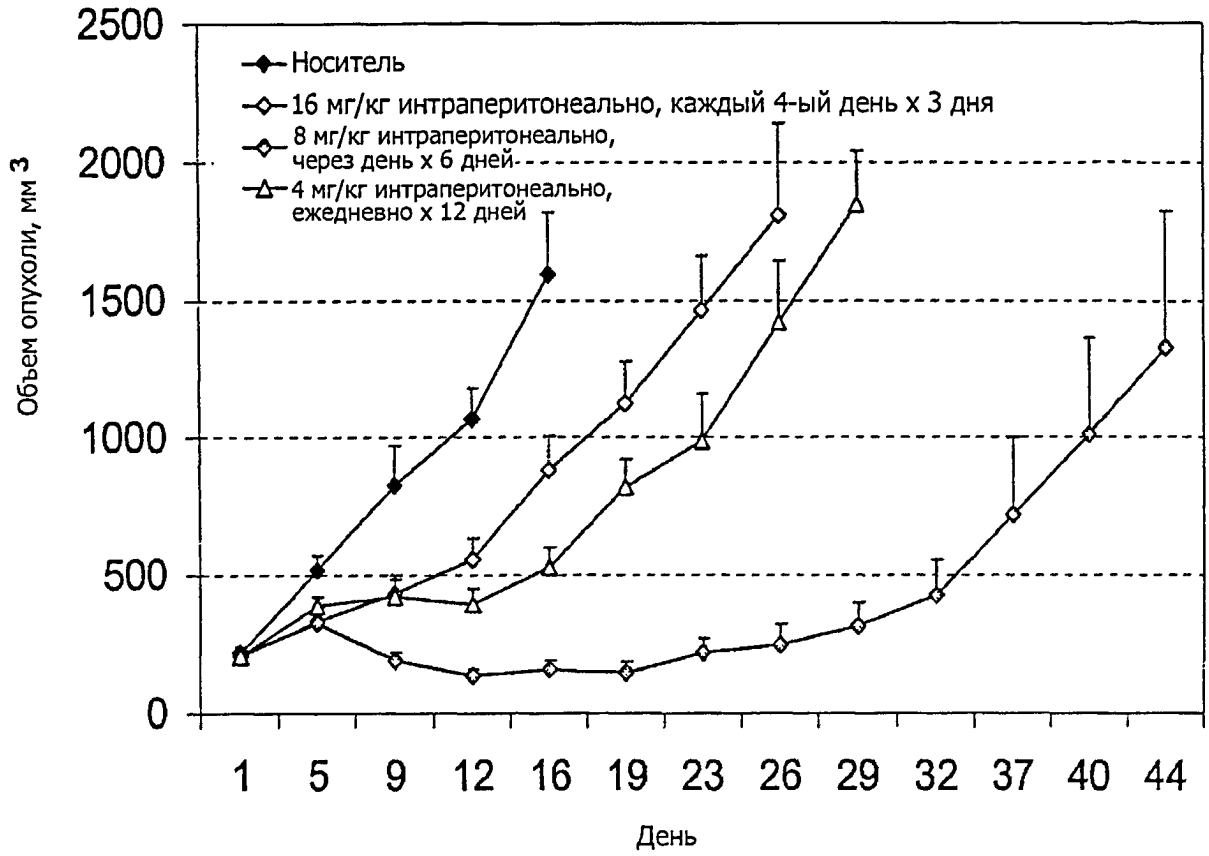
Фиг. 7


10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
% от общего количества клеток
Монополярные
Биполярные
Носитель, 24 ч
48 ч
5 мг/кг, 24 ч
48 ч
10 мг/кг, 24 ч
48 ч
20 мг/кг, 24 ч
48 ч
30 мг/кг, 24 ч
48 ч

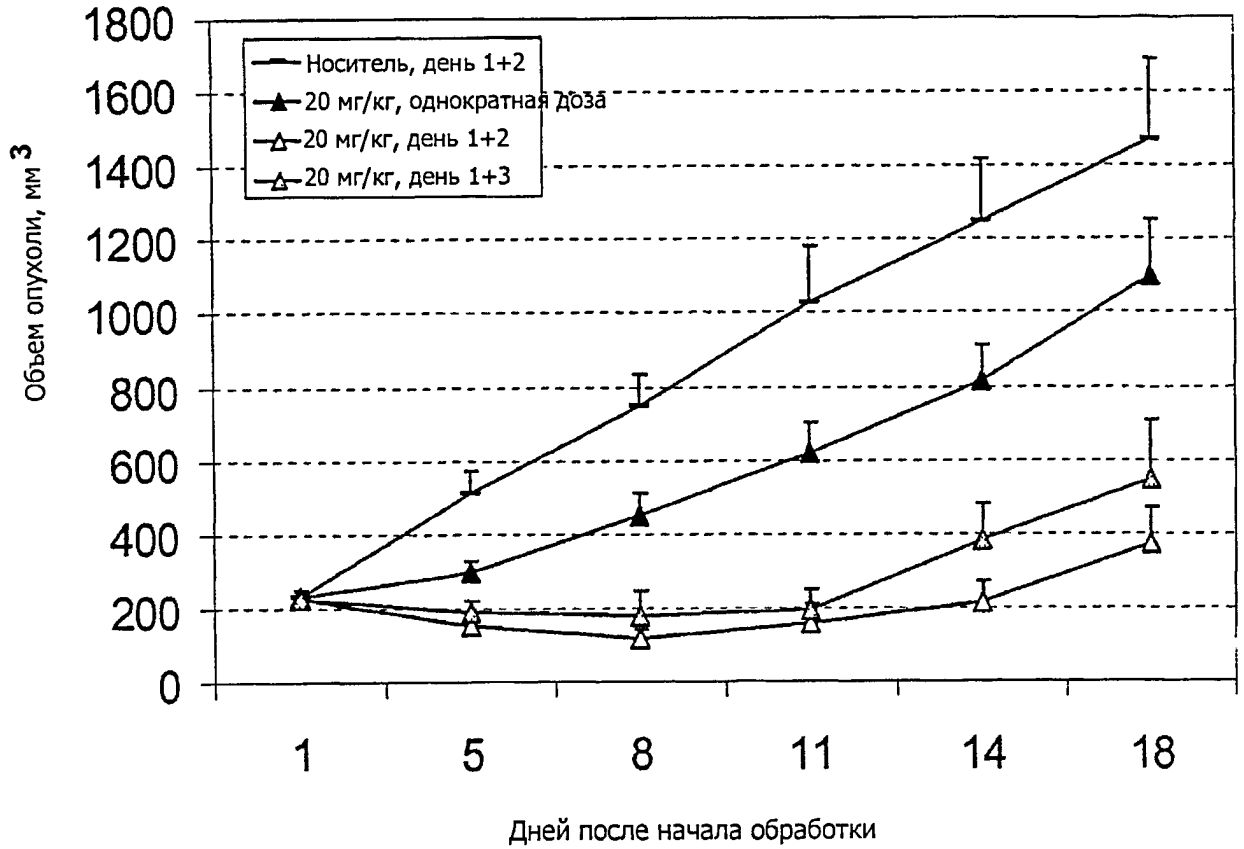
Фиг. 8


% TUNEL-положительных клеток
0
1
2
3
4
5
Носитель, 24 ч
48 ч
5 мг/кг, 24 ч
48 ч
10 мг/кг, 24 ч
48 ч
20 мг/кг, 24 ч
48 ч
30 мг/кг, 24 ч
48 ч
Обработка

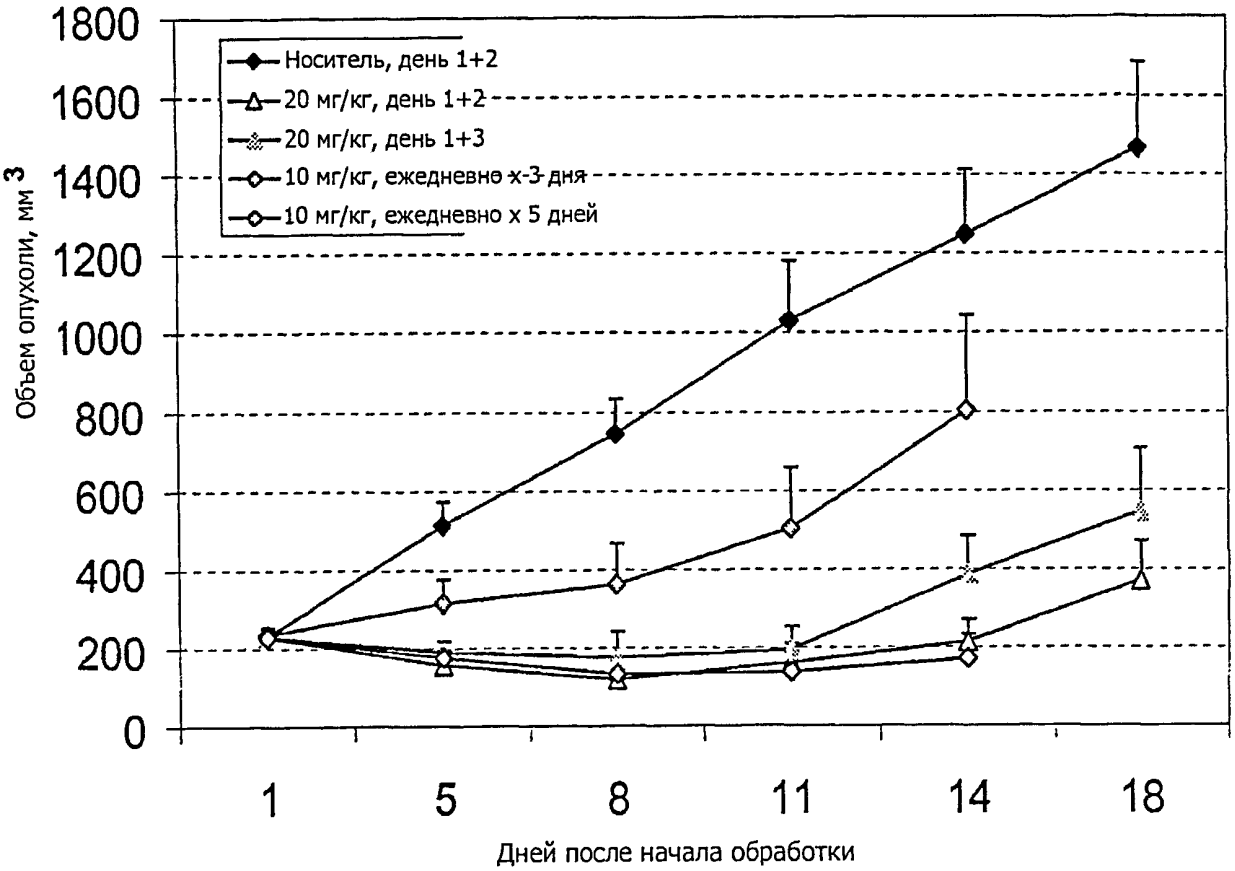
Фиг. 9


2500
2000
1500
1000
500
0
Объем опухоли, мм 3
Носитель
16 мг/кг интраперитонеально, каждый 4-ый день x 3 дня
8 мг/кг интраперитонеально, через день x 6 дней
4 мг/кг интраперитонеально, ежедневно x 12 дней
1 5 9 12 16 19 23 26 29 32 37 40 44
День

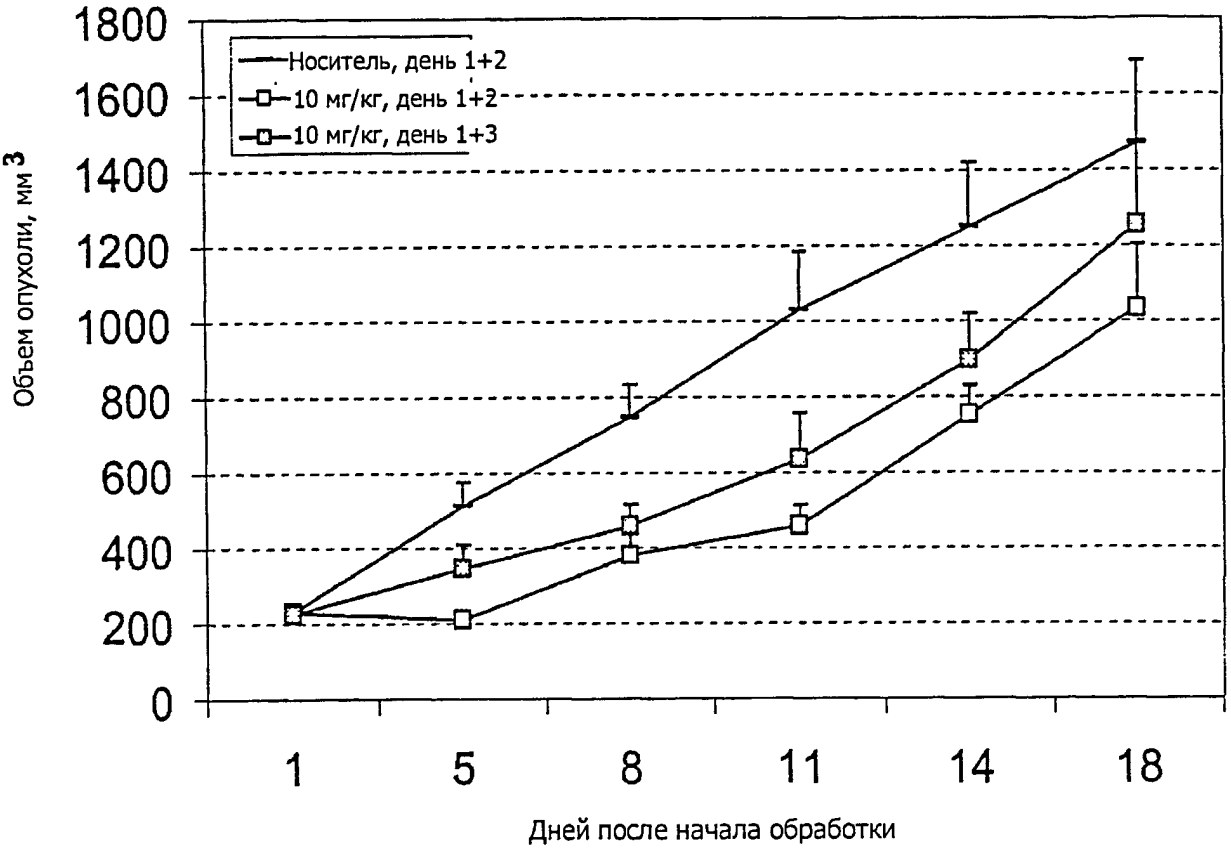
Фиг. 10


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли, мм 3
Носитель, день 1+2
20 мг/кг, однократная доза
20 мг/кг, день 1+2
20 мг/кг, день 1+3
1 5 8 11 14 18
Дней после начала обработки

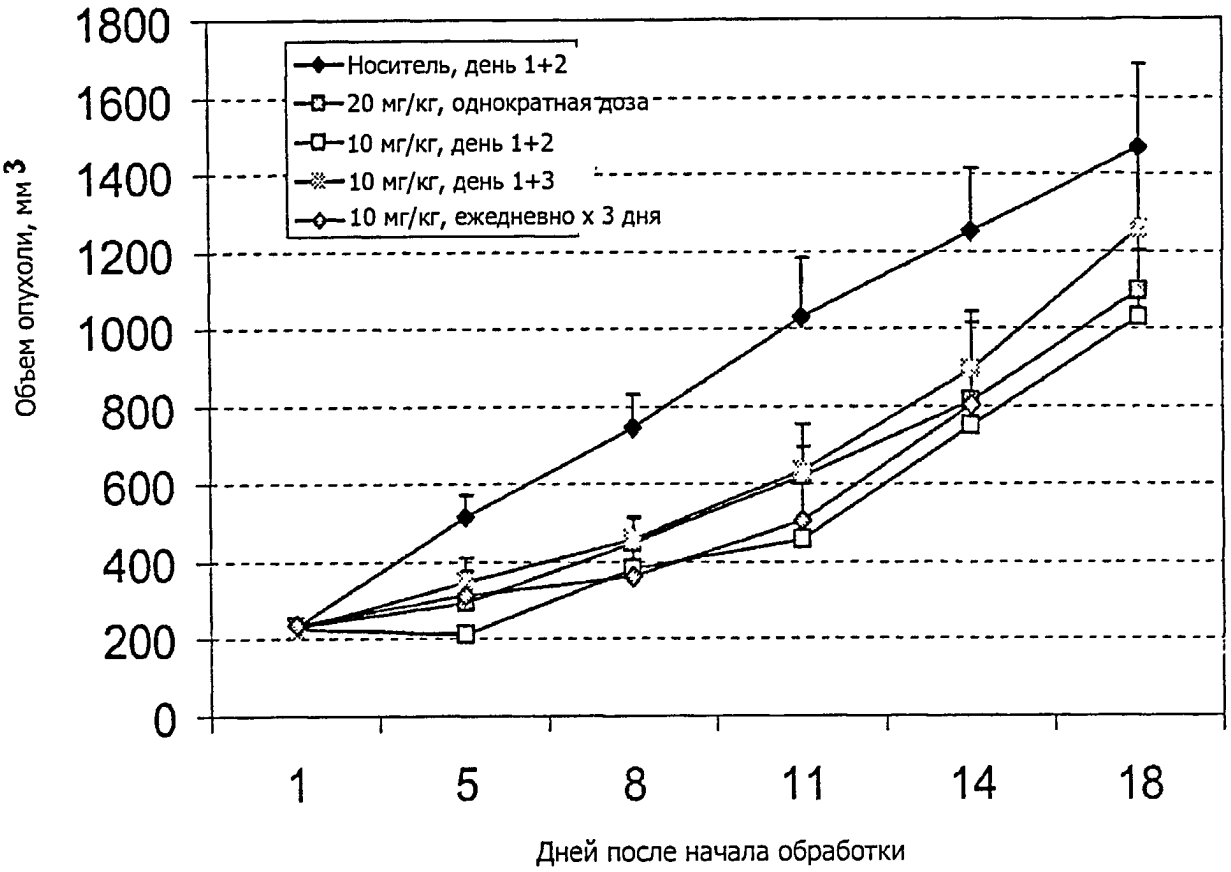
Фиг. 11


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли, мм3
Носитель, день 1+2
20 мг/кг, день 1+2
20 мг/кг, день 1+3
10 мг/кг, ежедневно x 3 дня
10 мг/кг, ежедневно x 5 дней
1
5
8
11
14
18
Дней после начала обработки

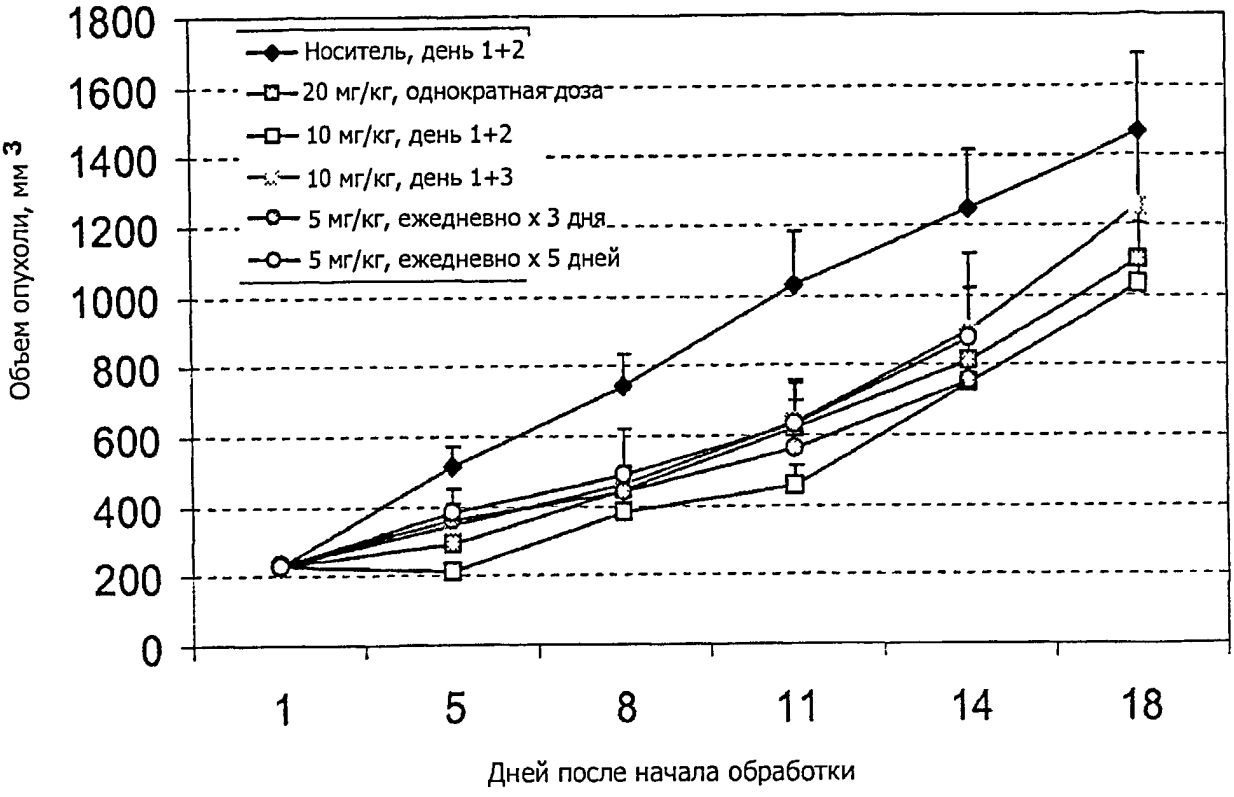
Фиг. 12


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли, мм3
Носитель, день 1+2
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3
1
5
8
11
14
18
Дней после начала обработки

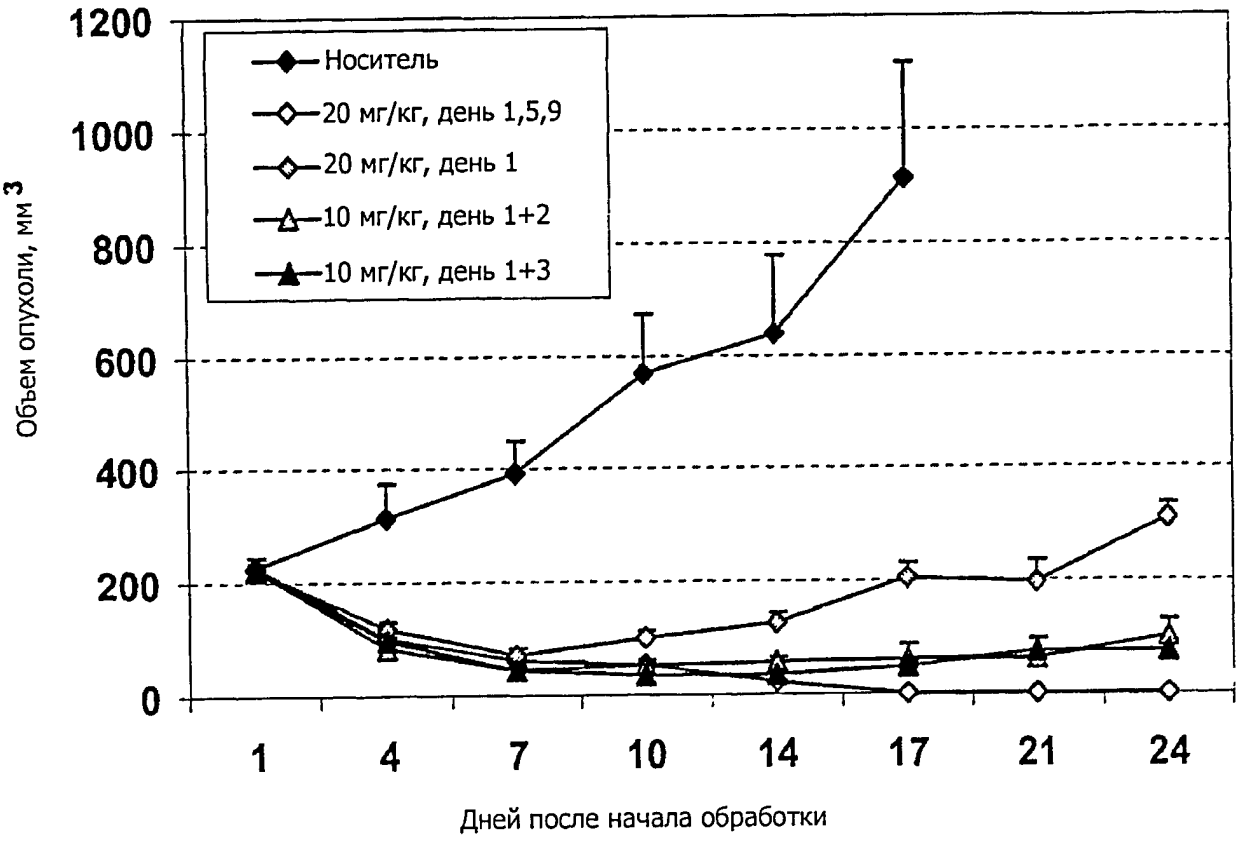
Фиг. 13


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Носитель, день 1+2
20 мг/кг, однократная доза
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3
10 мг/кг, ежедневно x 3 дня
Объем опухоли, мм3
1
5
8
11
14
18
Дней после начала обработки

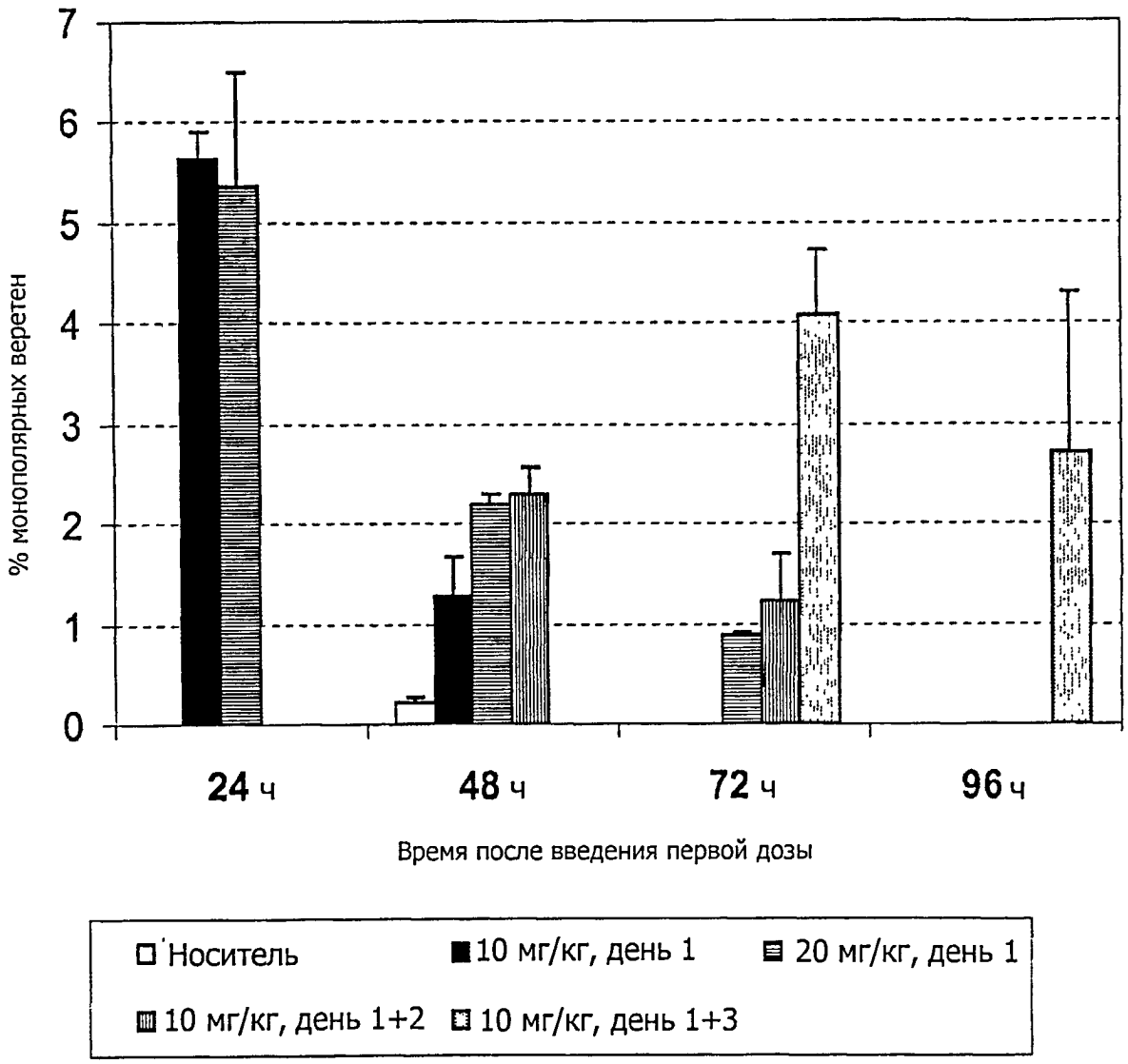
Фиг. 14


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Носитель, день 1+2
20 мг/кг, однократная доза
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3
5 мг/кг, ежедневно x 3 дня
5 мг/кг, ежедневно x 5 дней
Объем опухоли, мм3
1
5
8
11
14
18
Дней после начала обработки

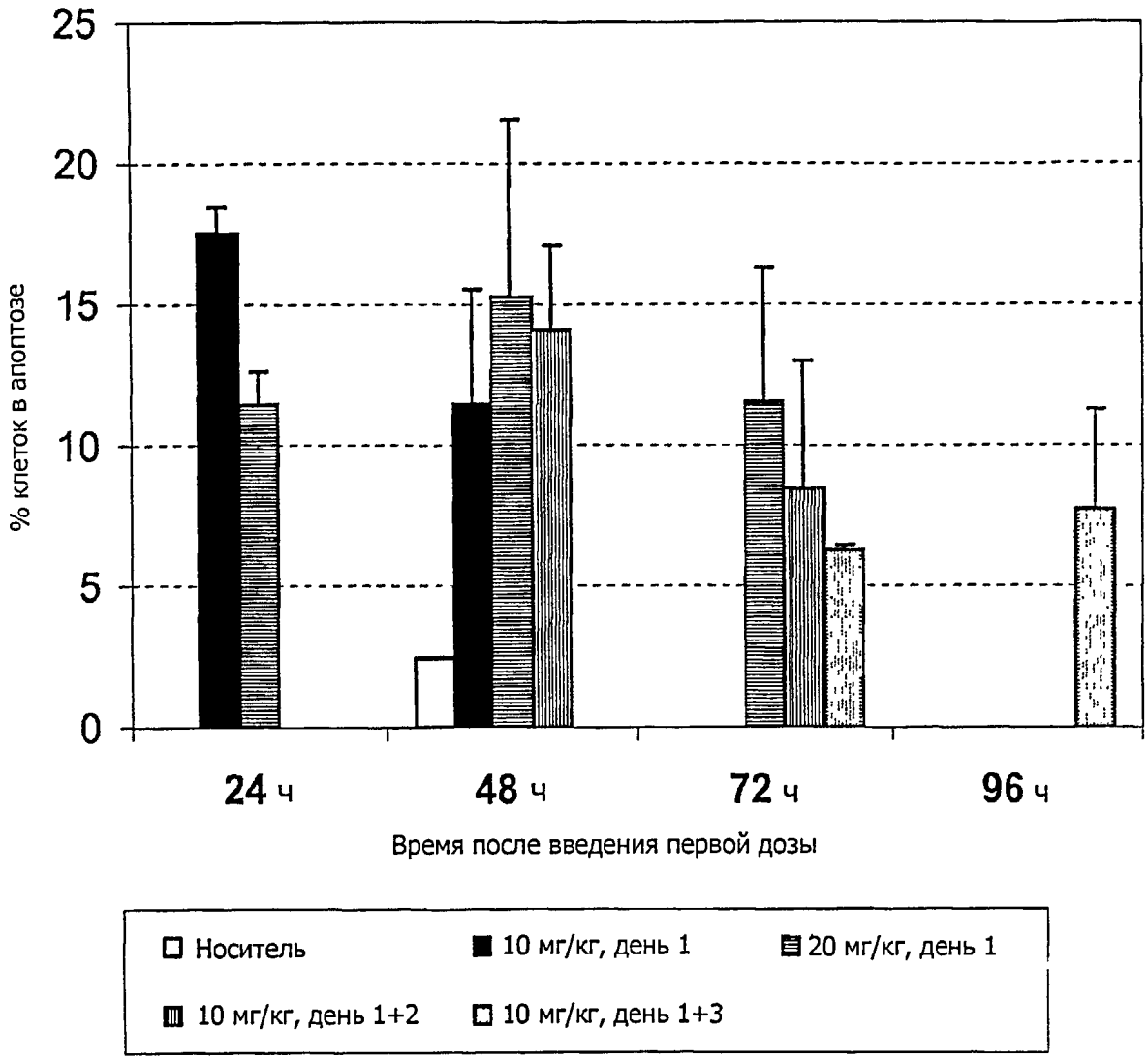
Фиг. 15


1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли, мм 3
Носитель
20 мг/кг, день 1,5,9
20 мг/кг, день 1
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3
1
4
7
10
14
17
21
24
Дней после начала обработки

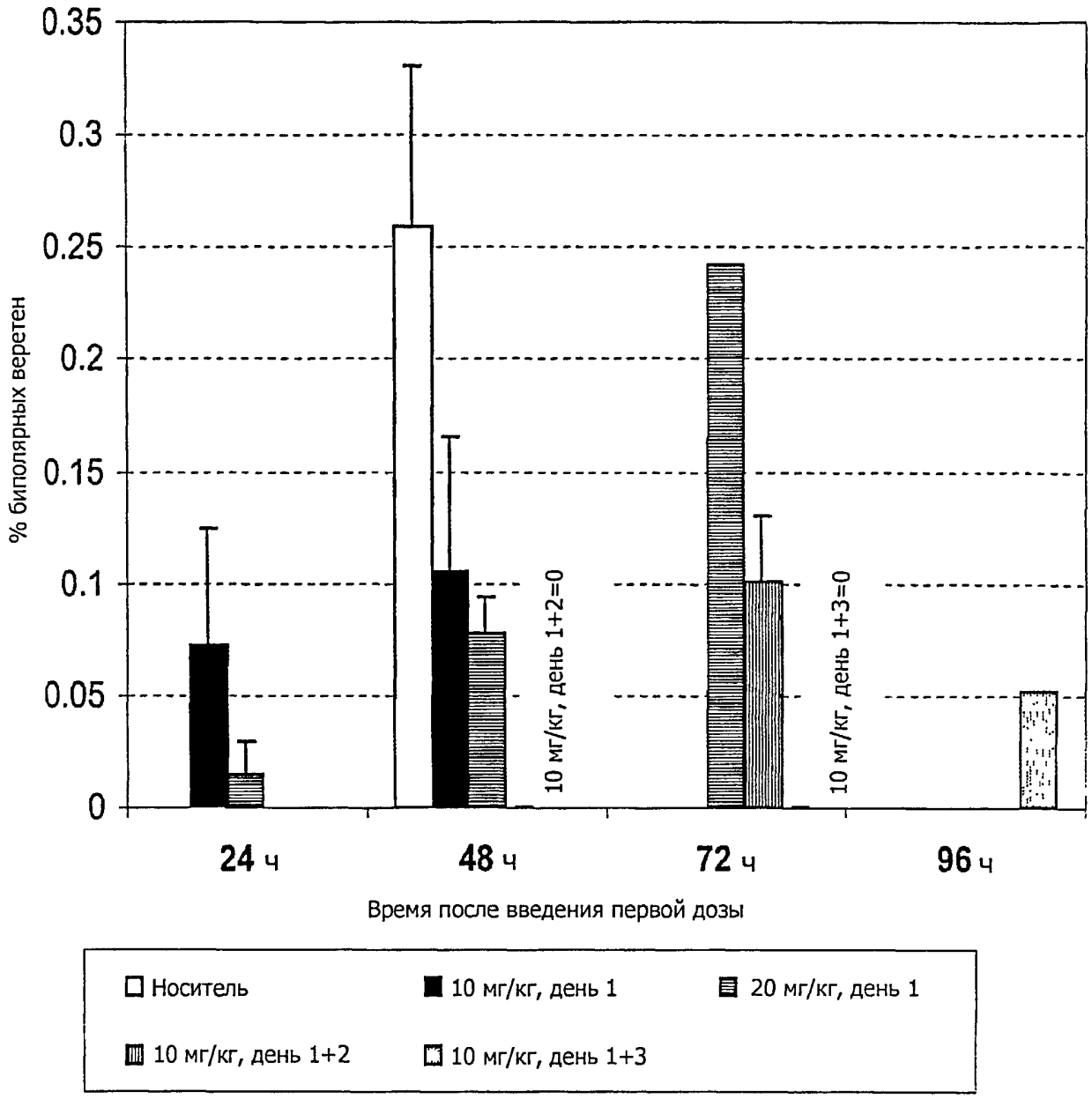
Фиг. 16


7
6
5
4
3
2
1
0
% монополярных веретен
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
Время после введения первой дозы
Носитель
10 мг/кг, день 1
20 мг/кг, день 1
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3

Фиг. 17


25
20
15
10
5
0
% клеток в апоптозе
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
Время после введения первой дозы
Носитель
10 мг/кг, день 1
20 мг/кг, день 1
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3

Фиг. 18


0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
% биполярных веретен
10 мг/кг, день 1+2=0
10 мг/кг, день 1+3=0
24 ч
48 ч
72 ч
96 ч
Время после введения первой дозы
Носитель
10 мг/кг, день 1
20 мг/кг, день 1
10 мг/кг, день 1+2
10 мг/кг, день 1+3

Фиг. 19