

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 3220

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.03.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.03.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/192278**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**
(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/09193**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/072721**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/5513

C 07 D 243/06

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:
**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, Princeton,
NJ, US;**

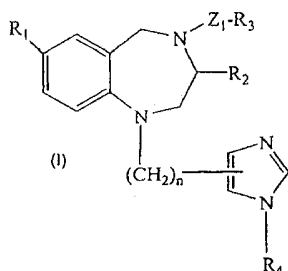
(72) Původce:
Lee Francis Y., Yardley, PA, US;

(74) Zástupce:
Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Synergní způsoby a prostředky pro léčbu nádorů

(57) Anotace:

Synergní způsob pro léčbu nádorů, při kterém je savci potřebujícímu léčbu podáno synergní, terapeuticky účinné množství: (1) alespoň činidla vybraného ze skupiny zahrnující cytotoxická činidla a cytostatická činidla, a (2) sloučeniny vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli. Dále farmaceutický prostředek pro synergní léčbu nádorů, který obsahuje alespoň jedno činidlo vybrané ze skupiny zahrnující antiproliferativní cytotoxická činidla a antiproliferativní cytostatická činidla, a sloučeniny vzorce I, a farmaceuticky přijatelný nosič.



Synergni způsoby a prostředky pro léčbu nádorů

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká léčby nádorů, přesněji synergního použití dvou nebo více protinádorových činidel majících antiproliferativní cytotoxické a cytostatické aktivity.

Dosavadní stav techniky

Chemoterapie, systémové podávání antineoplastických činidel, která se distribuují v těle krevní cirkulací, společně s chirurgickou a/nebo radioterapeutickou léčbou, je po mnoho let používána pro léčbu různých nádorů. Naneštěstí dostupná chemoterapeutika často selhávají v léčbě pacientů, protože zabíjejí mnoho zdravých buněk a proto mají nežádoucí účinky, které omezují možnou aplikovanou dávku.

Konkrétně, nádory jsou obtížně léčitelné proto, že obsahují jak proliferující, tak neproliferující nádorové buňky. Při růstu nádorů nestačí často vznik nových cév rychlé proliferaci populace maligních nádorových buněk. Proto mají solidní nádory často abnormální síť krevních cév, které - oproti normálním cévám - nedostačují v nutričním zásobování nádorových buněk pro optimální růst. U většiny solidních nádorů tvoří neproliferující buňky většinu populace nádorových buněk. Dále, se zvyšováním velikosti nádoru se také zvyšuje proporce neproliferujících nádorových buněk. Protože většina současných protinádorových činidel působí na proliferující buňky, považuje se populace neproliferujících nádorových buněk za hlavní faktor přispívající k selhání radioterapie nebo chemoterapie, samostatně nebo v kombinaci, při léčbě nádorových onemocnění.

Jak bylo uvedeno výše, s růstem se nádor obvykle stává refrakterním na většinu chemoterapeutických činidel. Proto mnoho postupů pro eradikaci nádoru zahrnuje debulking pro zmenšení masы nádoru před podáním antineoplastických činidel. Nicméně, debulking nevede vždy k eradikaci nádoru, i když je kombinován s účinnými chemoterapeutickými činidly. Proto v oboru existuje potřeba nových způsobů léčby postihujících jak proliferující, tak neproliferující nádorové buňky.

WO 98/54966 popisuje kombinovanou léčbu využívající antineoplastické činidlo nebo radioterapii společně s inhibitorem prenyl-protein transferasy, která může být užitečná v léčbě nádorů. Nicméně, WO 98/54966 nepopisuje použití sloučenin vzorce I podle předkládaného vynálezu.

U.S. patent 6,011,029 popisuje sloučeniny vzorce I podle předkládaného vynálezu a poskytuje způsoby jejich použití jako protinádorových činidel. Dále tento patent genericky popisuje, že sloučeniny vzorce I mohou být použitelné v kombinaci s jinou protinádorovou léčbou. Nicméně, U.S. patent 6,011,029 nepopisuje žádnou konkrétní kombinaci způsobů léčby ani nepoukazuje na kombinace, které působí synergně jako protinádorová léčba.

Proto je předmětem předkládaného vynálezu synergní způsob pro léčbu nádorů.

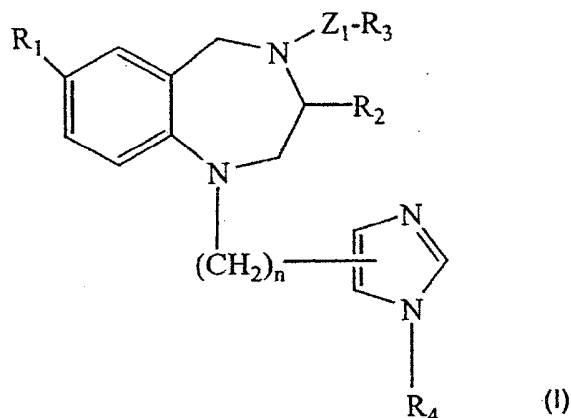
Dalším předmětem předkládaného vynálezu je farmaceutický prostředek pro synergní léčbu nádorů.

Tyto a další předměty předkládaného vynálezu budou jasné z popisu uvedeného dále.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje synergní způsob pro léčbu nádorů, při kterém je savci vyžadujícímu léčbu podáno synergně terapeuticky účinné množství (1) alespoň jednoho činidla vybraného ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a anti-proliferativní cytostatická činidla, a (2)

a sloučeniny vzorce I



nebo její farmaceuticky přijatelné soli, kde

R_1 je Cl, Br, ON, volitelně substituovaný fenyl, nebo volitelně substituovaný 2-, 3- nebo 4-pyridyl;

R_2 je volitelně substituovaný nižší alkyl, nebo volitelně substituovaný aralkyl;

R_3 a R_5 jsou každý nezávisle volitelně substituovaný nižší alkyl, volitelně substituovaný aryl, nebo volitelně substituovaný heterocyklus;

R_4 je vodík nebo nižší alkyl;

Z_1 je CO, SO_2 , CO_2 nebo $SO_2N(R_5)-$; a

n je 1 nebo 2;

s podmínkou, že cytotoxické činidlo a/nebo cytostatické činidlo je podáno simultánně s nebo před sloučeninou vzorce I.

Předkládaný vynález dále poskytuje a farmaceutický prostředek pro synergní léčbu nádorů, který obsahuje alespoň jedno činidlo

vybrané ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a anti-proliferativní cytostatická činidla, a sloučeninu vzorce I, a farmaceuticky přijatelný nosič.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je cytotoxické nebo cytostatické činidlo podáno před podáním sloučeniny vzorce I. V jiném provedení předkládaného vynálezu je cytotoxické nebo cytostatické činidlo podáno simultánně se sloučeninou vzorce I.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 ilustruje, že v HCT116 modelu lidského kolorektálního karcinomu kultivovaného na holých myších je valná většina nádorových buněk v neproliferativním (G₀) stadiu. Neproliferující buňky přítomné v HCT-116 lidském kolorektálním karcinomu kultivovaném podkožně byly identifikovány prodlouženým BrdUrd značením (24 h) pomocí kontinuální infuze. Pouze 20% celkové populace nádorových buněk dispergovaných ze solidního nádoru se barvilo pozitivně na BrdUrd, což selektivně značí proliferující buňky.

Obr. 2 ilustruje selektivní působení sloučeniny 2 na neproliferující HCT-116 nádorové buňky in vitro. Nádorové buňky v exponenciálním růstu (nekonfluentní a rychle proliferující buňky ze dne 2) byly >44-krát méně citlivé na sloučeninu 2 (IC₉₀ = 0,3 M) než nádorové buňky ve stacionární fázi růstu (vysoce konfluentní a neproliferující buňky ze dne 8).

Obr. 3 ilustruje selektivní působení sloučeniny 6 na neproliferujících HCT-116 nádorové buňky in vitro. Nádorové buňky ve fázi exponenciálního růstu (nekonfluentní a rychle proliferující buňky ze dne 2) byly 67-krát méně citlivé na sloučeninu 6 (IC₉₀ = 1,04 M) než nádorové buňky ve stacionární

fázi růstu (vysoce konfluentní a neproliferující buňky ze dne 8).

Obr. 4 ilustruje selektivní působení sloučeniny 4 na neproliferujících HCT-116 nádorové buňky in vitro. Nádorové buňky ve fázi exponenciálního růstu (nekonfluentní a rychle proliferující buňky ze dne 2) byly 91,2-krát méně citlivé na sloučeninu 4 ($IC_{50} = 1,05 \text{ M}$) než nádorové buňky ve stacionární fázi růstu (vysoce konfluentní a neproliferující buňky ze dne 8).

Obr. 5 ilustruje, že oproti sloučenině 2 a od ní odvozených sloučenin, ovlivňují anti-proliferativní činidla, jako je paclitaxel, selektivně proliferující HCT-116 nádorové buňky in vitro. Nádorové buňky ve fázi exponenciálního růstu (nekonfluentní a rychle proliferující buňky ze dne 2) byly >10-krát více citlivé na paclitaxel ($IC_{50} = 17,8 \text{ nM}$) než nádorové buňky ve stacionární fázi růstu (vysoce konfluentní a neproliferující buňky ze dne 8).

Obr. 6 ilustruje, že epothilony, jiná třída antineoplastických, anti-proliferativních činidel, paclitaxel, selektivně ovlivňují proliferující buňky. Nádorové buňky ve fázi exponenciálního růstu (nekonfluentní a rychle proliferující buňky ze dne 2) byly >83-krát více citlivé na epothilon B ($IC_{50} = 1,3 \text{ nM}$) než nádorové buňky ve stacionární fázi růstu (vysoce konfluentní a neproliferující buňky ze dne 8).

Obr. 7 ukazuje výsledky kombinované chemoterapie sloučeninou 2 a paclitaxelem u lidské nádorové linie tlustého střeva, HCT116, Tato data ukazují, že použití kombinace sloučeniny 2 a paclitaxelu při léčbě HCT116 nádorových buněk in vitro vede k synergní protinádorové aktivitě. Bylo prokázáno, že sekvence, ve které jsou tato dvě činidla podána, je významná pro vznik synergie. Paclitaxel podaný jako první během 20 hodin,

následovaný sloučeninou 2 (0,33 pM) během dalších 20 hodin vykazovaly jasnou synergii, stejně jako simultánní podání těchto dvou činidel v uvedených koncentracích během 20 hodin. Naopak, aplikace sloučeniny 2 (0,3 pM) následovaná aplikací paclitaxelu byla antagonistická.

Obr. 8 ukazuje kombinovanou chemoterapii sloučeninou 2 a sloučeninou 1 u buněčné linie lidského karcinomu střeva HCT116. Tato data ukazují, že použití kombinace sloučeniny 2 a sloučeniny 1 při léčbě HCT116 nádorových buněk in vitro vede k jasné synergní protinádorové aktivitě. Sloučenina 1 byla aplikována během prvních 20 hodin a sloučenina 2 (1 pM) byla aplikována během druhých 20 hodin.

Obr. 9 a 10 dále ilustrují synergii kombinované chemoterapie za použití sloučeniny 2 a sloučeniny 1. Synergie dosažená při různých koncentracích sloučeniny 1 a sloučeniny 2 se zdála být nezávislá na koncentraci činidel použité v kombinaci. V případě sloučeniny 2, koncentrace 1 M (Obr. 8), 0,33 M (Obr. 9) a 0,11 M (Obr. 10) produkovaly synergní interakce s různými koncentracemi sloučeniny 1. V těchto pokusech byla sloučenina 1 aplikována jako první během 20 hodin a potom byla během dalších 20 hodin aplikována sloučenina 2.

Obr. 11 demonstruje synergii in vivo na lidských nádorových xenotransplantátech (HCT116 linie lidského karcinomu střeva) kultivovaných na holých myších, která byla dosažena při kombinované chemoterapii za použití sloučeniny 2 a paclitaxelu. V tomto pokusu byla sloučenina 2 podávána pomalou iv infusí (24 hodin) v dávce 125 mg/kg. Paclitaxel byl podán ip v dávce 24 mg/kg na konci infuse sloučeniny 2 (což se považuje za simultánní podání).

Obr. 12 ukazuje synergii in vivo na lidských nádorových xenotransplantátech resistantních na paclitaxel (Pat-7 lidský ovariální karcinom) kultivovaných na holých myších při použití kombinované chemoterapie sloučeninou 2 a paclitaxelem.

Paclitaxel a sloučenina 2 byly podány simultánně; paclitaxel iv cestou a sloučenina 2 ip cestou. Uvedená data ukazují maximální tolerované režimy: paclitaxel (36 mg/kg, iv, q3dx3); sloučenina 2 (350 mg/kg, ip, q3dx3).

Obr. 13 ukazuje terapeutickou synergii in vivo na lidských nádorových xenotransplantátech s mnohotnou lékovou resistencí (HCTVM46 linie lidského karcinomu střeva) kultivovaných na holých myších po chemoterapii za použití kombinace sloučeniny 2 a sloučeniny 1. Sloučenina 1 byla podána iv 24 hodin před podáním sloučeniny 2 ip. Uvedená data ukazují maximální tolerované režimy: sloučenina 1 samostatně (15 mg/kg, q4dx3), sloučenina 2 samostatně (400 mg/kg, q4dx3), kombinace (sloučenina 1, 6 mg/kg a potom sloučenina 2, 400 mg/kg).

Obr. 14 ukazuje závislost kombinace sloučeniny 1 a sloučeniny 2 in vivo na lidských nádorových xenotransplantátech s mnohotnou lékovou resistencí (HCTVM46 linie lidského karcinomu střeva) kultivovaných na holých myších na protokolu aplikace. Oproti protokolům popsaným výše podání sloučeniny 2 jeden den před sloučeninou 1 nevede k terapeutické synergii. Uvedená data ukazují maximální tolerované režimy: sloučenina 1 samostatně (10 mg/kg, iv, q4dx3), sloučenina 2 samostatně (400 mg/kg, ip, q4dx3), kombinace (sloučenina 2, 300 mg/kg, a potom sloučenina 1, 10 mg/kg).

Obr. 15 ukazuje, že kombinace sloučeniny 2 a CPT-11 má synergní protinádorovou aktivitu u pokročilého (300-500 mg) lidského karcinomu střeva HCT1 16 kultivovaného na holých myších. CPT-11

byl podán 1 hodinu před sloučeninou 2. CPT-11 byl podán i.v. v přibližně MTD 30 mg/kg/inj. Sloučenina 2 byla podána ve dvou různých dávkách: 60 a 80 mg/kg/inj, i.v.

Obr. 16 (A) ukazuje, že kombinace gemcitabin (Gem) plus sloučenina 2 vyvolává zesílenou inhibici nádorového růstu lidského karcinomu střeva HT-29. Obr. 16(B) ukazuje, že synergní protinádorová aktivita kombinace Gemcitabin a sloučenina 2 také platí tehdy, když je regrese nádoru použita jako konečný výsledek nádorové odpovědi. Gem byl podán 1 hodinu před sloučeninou 2. Gem byl podán i.v. ve dvou dávkách, 24 a 36 mg/kg/inj, q2d x 4 (MTD = 36 mg/kg/inj.). Sloučenina 2 byla podána ve dvou různých dávkách: 60 a 80 mg/kg/inj, i.v.

Obr. 17 (A) ukazuje, že kombinace paclitaxel (Ptxl) plus sloučenina 2 má synergní protinádorovou aktivitu, z hlediska nádorového růstu, proti lidského karcinomu střeva HCT116. Obr. 17(B) ukazuje, že synergní protinádorová aktivita kombinace paclitaxelu a sloučeniny 2 platí také pro regresi nádoru, když je použita jako hodnocený výsledek reakce nádoru. Paclitaxel byl podán 3 hodiny před sloučeninou 2. Paclitaxel byl podán i.v. v dávce 20 mg/kg/inj, Q7D x 4. Sloučenina 2 byla podána ve dvou různých dávkách : 40 a 80 mg/kg/inj, IV.

Obr. 18A-18G ukazuje protinádorové účinky různých protinádorových činidel použitých samostatně nebo v kombinaci. Výsledky ukazují, že sloučenina 2 a inhibitor Her-1, (sloučenina 8), vykazují v kombinaci synergní cytotoxické účinky in vitro proti Her-1 aktivované SAL-2 nádorové buněčné linii (srovnej obr. 18B s obr. 18D). Obr. 18A: Klonogenní přežívání SAL-2 buněčné linie po expozici paclitaxelu po dobu 20 hodin při uvedené koncentraci. Obr. 18B: Klonogenní přežívání SAL-2 buněčné linie po expozici sloučenině 2 po dobu 20 hodin při uvedené

koncentraci Obr. 18C: Antagonistická interakce mezi paclitaxelem a inhibitorem Her-1, sloučeninou 8. SAL-2 buňky byly nejprve ošetřeny sloučeninou 8 po dobu 20 hodin před následujícím ošetřením paclitaxelem po dobu dalších 20 hodin. Obr. 18D: Synergická interakce mezi sloučeninou 2 a inhibitorem Her-1, sloučeninou 8. SAL-2 buňky byly nejprve ošetřeny sloučeninou 9 po dobu 20 hodin před následujícím ošetřením sloučeninou 2 po dobu dalších 20 hodin. Sloučenina 2 zesiluje protinádorovou aktivitu inhibitoru Her-1 (EGFR) Iressar v A431 buněčné linii lidského spinocelulárního karcinomu plic nadměrně exprimující Her-1 transplantované holým myším. Obr. 18E: Kombinované účinky Iressyr (200 mg/kg/apl., PO, Q1D x 11) a sloučeniny 2 (60 mg/kg/inj., IV, Q2D x 5). Terapie Iressour byla zahájena 3 dny před zahájením léčby sloučeninou 2. Obr. 18F: Kombinované účinky Iressyr (200 mg/kg/apl., PO, Q1D x 11) a sloučeniny 2 (80 mg/kg/inj., IV, Q2D x 5). Obr. 18G: Kombinované účinky Iressyr (200 mg/kg/adm, PO, Q1D x 11) a paclitaxelu (24 mg/kg/inj., IV, Q2D x 5).

Obr. 19 ukazuje, že kombinovaná léčba sloučeninou 2 a Herceptinem má synergickou antiproliferativní aktivitu proti BT474 buněčné linii lidského karcinomu prsu. Léčba Herceptinem byla zahájena 2 dny před aplikací sloučeniny 2, jak je na obr. uvedeno.

Obr. 20. Sloučenina 2 zvyšuje protinádorovou aktivitu Tamoxifenu u xenotransplantátů MCF-7 estrogen-dependentní buněčné linie karcinomu prsu na holých myších. Tamoxifen byl podán PO, Q2D x 14. Sloučenina 2 byla podána PO ve dvou sériích, Q1D x 10, jak je uvedeno na obr.

Obr. 21. Sloučenina 2 zvyšuje protinádorovou aktivitu chirurgické kastrace u xenotrasplantátů androgen-dependentní

lidské prostatické nádorové buněčné linie MDA-PCa-2b na holých myších. Chirurgická kastrace byla provedena v den 21 po implantaci nádorů. Terapie sloučeninou 2 a paclitaxelem byla zahájena 3 dny po chirurgické kastraci. Sloučenina 2 byla podána P0 Q1D x 10. Paclitaxel byl podán IV, Q2D x 5.

Obr. 22. Sloučenina 2 zvyšuje protinádorovou aktivitu inhibitoru androgenního receptoru Casodexur proti androgen-independením, Casodexr-responsivním xenotransplantátům lidského karcinomu prostaty MDA-PCa-2b-AI na holých myších. Casodexr byl podán P0, Q1D x 10, terapie sloučeninou 2 byla zahájena 3 dny po Casodexur. Sloučenina 2 byla podána P0, Q1D x10.

Obr. 23 ukazuje, že kombinace CDK inhibitoru (CDKI), sloučeniny 9, se sloučeninou 2, má sekvenčně-dependentní, synergní cytotoxické účinky na A2780 lidské ovariální nádorové buňky in vitro. 4 hodinová terapie 1,5 M sloučeniny 9 (dávka nemající účinek) byla kombinována s 20 hodinovou terapií zvyšující se koncentrací sloučeniny 2. Tvorba kolonií se skórovala v den 10. Panel A, ošetření CDKI předcházelo aplikaci sloučeniny 2. Panel B, aplikace sloučeniny 2 předcházela aplikaci CDKI.

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje způsob pro synergní léčbu nádorů, který zahrnuje synergní podání terapeuticky účinného množství: (1) alespoň jednoho činidla vybraného ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a anti-proliferativní cytostatická činidla; a (2) sloučeniny vzorce I, kde tato kombinace je podána savci, výhodně člověku, který potřebuje takovou léčbu.

Překvapivě bylo zjištěno, že použití: (1) alespoň jednoho anti-proliferativního cytotoxického činidla a/nebo anti-proliferativního cytostatického činidla, a (2) sloučeniny vzorce I, při použití v kombinaci, poskytuje synergní způsob pro léčbu nádorů. Termín "synergní", jak je zde použit, označuje to, že efekt dosažený způsoby a prostředky podle předkládaného vynálezu je vyšší efekty dosažené způsoby a prostředky obsahujícími cytotoxická nebo cytostatická činidla nebo činidlo, a sloučeniny vzorce 1 podle předkládaného vynálezu samostatně ve stejných množstvích. Výhodně umožňuje synergie mezi aktivními složkami použití menších dávek obou nebo jedné aktivní složky, což umožňuje použití nižší dávky antineoplastických činidel nebo činidla nebo radioterapie, poskytuje vyšší účinnost při stejných dávkách, a/nebo brání nebo oddaluje vznik mnohotné lékové resistance.

Další výhodou popsaných způsobů je to, že je možno měnit jednotlivé složky kombinace sloučenin vzorce I a alespoň jednoho činidlo vybraného ze skupiny zahrnující a cytostatické činidlo a cytotoxické činidlo podle charakteru nádorových buněk. Předpokládá se, že terapeutický efekt prostředků podle předkládaného vynálezu může být dosažen při nižších dávkách cytotoxického nebo cytostatického činidla(s) a sloučeniny vzorce I, než jsou dávky, které by bylo nutné použít při použití takového antineoplastického činidla a sloučeniny vzorce I samostatně. Tento přístup eliminuje jakoukoliv nežádoucí toxicitu nezaloženou na mechanismu účinku, která by mohla být důsledkem podání dávky antineoplastického činidla nebo činidel nebo sloučeniny vzorce I nebo radioterapie samostatně pro dosažení stejného terapeutického účinku. Prostředky podle předkládaného vynálezu mají synergní terapeutický účinek a vykazují neočekávaný terapeutický benefit ve srovnání s účinkem jakékoliv složky použité samostatně.

Rozsah selektivity dvou nebo více protinádorových činidel, která obsahuje způsob podle předkládaného vynálezu, poskytuje terapeutickou výhodu ve srovnání s dřívějšími způsoby využívajícími jednoho antineoplastického činidla pro léčbu nádorů. Konkrétně, použití dvou nebo více nezávislých farmaceuticky aktivních složek, které jsou mají komplementární, v podstatě se nepřekrývající aktivitu, umožňuje osobě využívající předkládaný způsob měnit nezávisle a přesně různé aktivity kombinace bez nutnosti syntézy léčiva majícího určitý farmaceutický profil. Dále, kombinace by měly účinně působit na proliferující i neproliferující buňky.

Anti-proliferativní cytotoxické činidlo, kam patří též radiaoterapie, může být podáno simultánně s nebo před sloučeninou vzorce I. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je anti-proliferativní cytotoxické činidlo a/nebo radiaoterapie aplikováno před sloučeninou vzorce I. Termíny "simultánně" nebo "simultánní" označují to, že antiproliferativní cytotoxické činidlo nebo radiaoterapie a sloučeniny vzorce I jsou podány během 24 hodin, výhodně 12 hodin, výhodněji 6 hodin a nejvýhodněji 3 hodin nebo méně.

Kromě anti-proliferativních cytotoxických činidel a radioterapie popsané výše mohou být pacientům podány také činidla, která způsobují to, že buňky se stanou neproliferujícími nebo klidovými, která se zde označují jako anti-proliferativní cytostatická činidla nebo činidla indukující klidové stadium. Anti-proliferativní cytostatická činidla mohou být podána simultánně nebo sekvenčně se sloučeninami vzorce I nebo radioterapií nebo cytotoxickými činidly.

Předkládaný vynález poskytuje způsoby pro synergní léčbu různých nádorů, včetně například následujících nádorů:

karcinomů, včetně karcinomu močového měchýře (včetně akcelerovaného a metastazujícího karcinomu močového měchýře), prsu, tlustého střeva (včetně kolorektálního karcinomu), ledvin, jater, plic (včetně malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic a adenokarcinomu plic), vaječníků, prostaty, varlat, genitourinárního traktu, lymfatického systému, rekta, laryngu, pankreatu (včetně karcinomu exokrinního pankreatu), jícnu, žaludku, žlučníku, čípku děložního, štítné žlázy a kůže (včetně spinocelulárního karcinomu); hematopoetických nádorů lymfoidní linie, včetně leukemia, akutní lymfocytární leukemie, akutní lymfoblastické leukemie, B-lymfocytárního lymfomu, T-lymfocytárního lymfomu, Hodgkinského lymfomu, non-Hodgkinského lymfomu, vlasatobuněčného lymfomu, histiocytárního lymfomu a Burkittova lymfomu; hematopoetických nádorů myeloidní linie, včetně akutní a chronické myeloidní leukemie, myelodysplastického syndromu, myeloidní leukemie a promyelocytární leukemie; nádorů centrálního a periferního nervového systému, včetně astrocytomu, neuroblastomu, gliomu a schwannomu; nádorů mesenchymového původu, včetně fibrosarkomu, rhabdomyosarkomu a osteosarkomu; a jiných nádorů, včetně melanomu, xenoderma pigmentosum, keratoakanthomu, seminomu, folikulárního karcinomu štítné žlázy a teratokarcinomu.

Nejvýhodněji je předkládaný vynález použit pro léčbu akcelerovaných nebo metastatických nádorů močového měchýře, pankreatu, prostaty, nemalobuněčného karcinomu plic, kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu.

Ve výhodném provedení vynálezu je poskytnut způsob pro synergní léčbu nádorů. Výhodně synergní způsob podle předkládaného vynálezu redukuje vývoj nádorů, snižuje mohutnost nádorového růstu, nebo produkuje regresi nádorů u savce.

Termín radioterapie, jak je zde použit, označuje záření X nebo gamma záření aplikované z externího zdroje, jako je pole, nebo implantací malých radioaktivních zdrojů. Radioterapie může být také považována za anti-proliferativní cytotoxické činidlo.

Termín "anti-neoplastické činidlo" je synonymní s termínem "chemoterapeutické činidlo" a označuje sloučeniny, které brání dělení nádorových buněk (t.j. anti-proliferativní činidla). Obecně, činidla podle předkládaného vynálezu spadají do dvou tříd, do třídy anti-proliferativních cytotoxických činidel a anti-proliferativních cytostatických činidel. Cytotoxická činidla brání dělení nádorových buněk: (1) interferencí se schopností buňky replikovat DNA; a (2) indukci smrti buňky a/nebo apoptosy nádorových buněk. Anti-proliferativní cytostatická nebo klidová činidla působí mechanismem modulace, interference nebo inhibice procesů přenosu signálu v buňkách, které regulují proliferaci buněk. Většina chemoterapeutických činidel jsou cytotoxická činidla a ovlivňují proliferující buňky.

Třídy sloučenin, které mohou být použity jako anti-proliferativní cytotoxická činidla, zahrnují následující třídy:

Alkylační činidla (včetně, například, nitrogen-mustardů, ethyleniminových derivátů, alkylsulfonátů, nitrosomočovin a triazenů): Uracil mustard, Chlormethin, Cyklophosphamid (Cytosan), Ifosfamid, Melphalan, Chlorambucil, Pipobroman, Triethylen-melamin, Triethylenethiofosforamin, Busulfan, Carmustin, Lomustin, Streptozocin, Dacarbazin a Temozolomid.

Antimetabolity (včetně, například, antagonistů kyseliny listové, analogů pyrimidinu, analogů purinu a inhibitorů adenosin deaminasy): Methotrexat, 5-Fluorouracil, Floxuridin, Cytarabin,

6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Fludarabin fosfát, Pentostatin a Gemcitabin.

Přírodních produktů a jejich derivátů (například, vinca alkaloidů, protinádorových antibiotik, enzymů, lymfokinů a epipodofyllotoxinů): Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin, AraC, paclitaxel (paclitaxel je komerčně dostupný jako Taxolr), Mithramycin, Deoxyco-formycin, Mitomycin-C, L-Asparaginasa, Interferony (zejména IFN-a), Etoposid a Teniposid.

Dalšími anti-proliferativními cytotoxickými činidly jsou navelbin, CPT-11, anastrozol, letrazol, capecitabin, reloxafin, cyklofosfamid, ifosamide a droloxafin.

Činidla ovlivňující mikrotubuly interferují s buněčnou mitosou a jsou dobře známá v oboru pro svou anti-proliferativní cytotoxickou aktivitu. Mezi činidla ovlivňující mikrotubuly podle předkládaného vynálezu patří, například, allocolchicin (NSC 406042), Halichondrin B (NSC 609395), colchicin (NSC 757), deriváty colchicinu (například, NSC 33410), dolastatin 10 (NSC 376128), maytansin (NSC 153858), rhizoxin (NSC 332598), paclitaxel (Taxolr, NSC 125973), Taxolr derivátů (například, deriváty (například, NSC 608832), thiocolchicin NSC 361792), tritylcystein (NSC 83265), vinblastin-sulfát (NSC 49842), vincristin-sulfát (NSC 67574), přírodní a syntetické epothilony včetně, například, epothilonu A, epothilonu B a discodermolidu (viz Service, (1996) Science, 274:2009), estramustin, nocodazol, MAP4 a podobně. Příklady takových činidel jsou také popsány v odborné a patentové literatuře, viz například, Bulinski (1997) J. Cell Sci. 110:3055 3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlradt (1997) Cancer Res. 57:3344-3346;

Nicolaou (1997) Nature 387:268-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell. 8:973-985; Panda (1996) J. Biol. Chem. 271:29807-29812.

Termín "paclitaxel", jak je zde použit, označuje lék komerčně dostupný jako Taxolr (NSC č.: 125973). Taxolr inhibuje replikaci eukaryotických buněk zvýšením polymerizace tubulinových skupin ve stabilizovaném dělicím vřeténku a vřeténka se potom nemohou reorganizovat na správnou strukturu pro mitosu. Z mnoha dostupných chemoterapeutických léků je paclitaxel významný pro svou účinnost proti nádorům refrakterním na léky, včetně nádorů prsu a ovarií (Hawkins (1992) Oncology, 6:17-23, Horwitz (1992) Trends Pharmacol. Sci. 13: 134-146, Rowinsky (1990) J. Natl. Canc. Inst. 82:1247-1259).

Zejména výhodná anti-proliferativní cytotoxická činidla jsou sloučeniny s aktivitou podobnou paclitaxelu. Mezi tyto sloučeniny patří, například, paclitaxel a deriváty paclitaxelu (paclitaxel-like sloučeniny) a analogy. Paclitaxel a jeho deriváty jsou komerčně dostupné. Dále, způsoby výroby paclitaxel a paclitaxelových derivátů a analogů jsou dobře známe v oboru (viz například, U.S. Patenty č: 5,569,729; 5,565,478; 5,530,020; 5,527,924; 5,508,447; 5,489,589; 5,488,116; 5,484,809; 5,478,854; 5,478,736; 5,475,120; 5,468,769; 5,461,169; 5,440,057; 5,422,364; 5,411,984; 5,405,972; a 5,296,506).

Tak mezi anti-proliferativní cytotoxická činidla vhodná pro použití ve způsobech a prostředcích podle předkládaného vynálezu patří, například, činidla stabilizující mikrotubuly, jako je paclitaxel (též známý jako Taxolr), docetaxel (též známý jako Taxotere), 7-C-methylthiomethylpaclitaxel (popsaný v U.S. č. 5,646,176), 4-desacetyl-4-methylkarbonátpaclitaxel, 3'-terc.butyl-3'-N-terc.butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxel (popsaný v USSN

60/179,965, podaném 3.2.2000 a v příkladu 17),
O-4-methylkarbonát-paclitaxel (popsaný ve WO 94/14787), epothilon
A, epothilon B, epothilon C, epothilon D, desoxyepothilon A,
desoxyepothilon B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,
16S*]]-7-11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-
(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]-
heptadekan-5,9-dion (popsaný v WO 99/02514), [1S-[1R*,3R*(E),
7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-
methylethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4-17-
dioxabicyklo[14.1.0]-heptadekan-5,9-dion (popsaný v USSN
09/506,481, podaném 17.2.2000, a v příkladech 7 a 8), a jejich
deriváty; a činidla narušující mikrotubuly.

Jako cytotoxické činidla jsou také vhodná činidla jako je
epidophyllotoxin; antineoplastické enzymy; inhibitory
topoisomerasy; procarbazin; mitoxantron; komplexy platiny, jako
je cis-platina a karboplatina; modifikátory biologické reakce;
růstové inhibitory; antihormonální terapeutická činidla;
leukovorin; tegafur; a hematopoetické růstové faktory.

Mezi další anti-proliferativní cytotoxická činidla patří
melphalan, hexamethylmelamin, thiotepa, cytarabin, idatrexat,
trimetrexat, dacarbazin, L-asparaginasa, camptothecin, topotekan,
bicalutamid, flutamid, leuprolid, pyridobenzoindolové deriváty,
interferony a interleukiny. Výhodnými třídami
antiproliferativních cytotoxických činidel jsou EGFR inhibitory,
Her-2 inhibitory, CDK inhibitory a Herceptin (trastuzumab).
Některými zejména výhodnými anti-proliferativními cytostatickými
činidly jsou paclitaxel, cis-platina, karboplatina, epothilony,
gemcitabin, CPT-11, 5-fluorouracil, tegafur, leukovorin a EGFR
inhibitory, jako je Iressa (ZD 1839, 4-(3-chlor-4-
fluorfenylamino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)propoxy)-
chinazolin a OSI-774 (4-(3-ethynylfenylamino)-6,7-bis(2-

methoxyethoxy) chinazolin).

V jednom provedení předkládaného vynálezu se z proliferujících nádorových buněk stanou neproliferující před nebo při léčbě cytostatickým činidlem podle předkládaného vynálezu. Termín "cytostatické činidlo" je synonymní s "klidovým činidlem" a označuje jakékoliv zpomalení rychlosti dělení buněk nebo růstu nádoru, při kterém se tyto buněk stanou neproliferujícími buňky nebo se jejich chování přiblíží neproliferujícím buňkám. Příklady anti-proliferativních cytostatických nebo "klidových" činidel podle předkládaného vynálezu zahrnují, například, hormony a steroidy (včetně syntetických analogů): 17a-ethinylestradiol, diethylstilbestrol, testosterone, prednison, fluoxymesteron, dromostanolonpropionat, testolakton, megestrolacetat, methylprednisolon, methyl-testosteron, prednisolon, triamcinolon, chlortrianisen, hydroxyprogesteron, aminoglutethimid, estramustin, medroxyprogesteroneacetat, leuprolid, flutamid, toremifen, zoladex.

Pro použití jako cytostatická činidla jsou také vhodné antiangiogenní sloučeniny, jako jsou inhibitory matrixových metalloproteinas a jiné VEGF inhibitory, jako jsou anti-VEGF protilátky a malé molekuly, jako je ZD6474 a SU6668. Anti-Her2 protilátky od Genetech mohou být také použity. Vhodným EGFR inhibitorem je EKB-569 (ireversibilní inhibitor). Také je možno použít Imclone protilátku 0225 imunospecifickou pro EGFR, a src inhibitory.

Pro použití jako cytostatická činidla je také vhodný Casodex (bicalutamid, Astra Zeneca), který způsobuje zástavu proliferace androgen-dependentních karcinomů. Jiným příkladem cytostatického činidla je antiestrogen Tamoxifen, který inhibuje proliferaci nebo růst estrogen-dependentních karcinomů prsu. Inhibitory

přenosu buněčných proliferčních signálů jsou také cytostatickými činidly. Příklady jsou inhibitory epidermálního růstového faktoru, Her-2 inhibitory, inhibitory MEK-1 kinasy, inhibitory MAPK kinasy, P13 inhibitory, inhibitory Src kinasy a PDGF inhibitory.

Jak bylo uvedeno, mezi cytostatická činidla také patří anti-angiogenní a antivaskulární činidla, která, prostřednictvím přerušení průtoku krve nádory, způsobují indukci klidového stavu nádorovým buněk v důsledku deplece nutrice. Kastrace, která také způsobuje zástavu proliferace androgen-dependentních karcinomů, může být také použita. Odstranění přísunu živin jiným než chirurgickým způsobem zastavení přítoku krve je dalším příkladem cytostatického zásahu. Zejména výhodnou třídou antivaskulárních cytostatických činidel jsou combretastatiny. Dalšími příklady cytostatických činidel jsou inhibitory MET kinasy, inhibitory MAP kinasy, inhibitory non-receptorové a receptorové tyrosin-kinasy, inhibitory integrinové signalizace a inhibitory receptorů pro insulin-like růstový faktor.

Ve výhodných provedeních předkládaného vynálezu zahrnuje způsob podání kombinace dvou nebo více antineoplastických činidel. Například, uvedená data ukazují, že xenotransplantáty lidského karcinomu prostaty MDA-PCa-2b se dostanou do klidového stadia po chirurgické kastraci subjektů před léčbou sloučeninou vzorce I.

Metody pro bezpečné a účinné podání většiny z těchto chemoterapeutických činidel jsou známé odborníkům v oboru. Jejich podávání je také popsáno ve standardní literatuře. Například, podávání mnoha chemoterapeutických činidel je popsáno v Physicians' Desk Reference (PDR), vyd. 1996 (Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645-1742, USA).

Výhodné sloučeniny vzorce I jsou ty, kde:

R_1 je Br nebo CN;

R_2 je volitelně substituovaný benzyl;

R_3 je volitelně substituovaný nižší alkyl, volitelně substituovaný fenyl, volitelně substituovaný 2-thienyl, nebo volitelně substituovaný 1-piperidyl;

R_4 je vodík nebo methyl;

Z_1 je CO, SO_2 nebo $SO_2N(R_5)-$;

R_5 je volitelně substituovaný nižší alkyl nebo volitelně substituovaný fenyl; a

n je 1.

Výhodnější sloučeniny vzorce I pro použití ve způsobech a prostředcích podle předkládaného vynálezu jsou ty sloučeniny, kde:

R_1 je CN;

R_2 je volitelně substituovaný benzyl;

R_3 je volitelně substituovaný nižší alkyl, volitelně substituovaný fenyl, volitelně substituovaný 2-thienyl, nebo volitelně substituovaný 1-piperidyl;

R_4 je vodík, nebo methyl;

Z je CO, nebo SO_2 ; a

n je 1,

Nejvýhodnější sloučeniny vzorce I pro použití v předkládaném vynálezu jsou ty sloučeniny, kde:

R_1 je CN;

R_2 je benzyl;

R_3 je n-propyl, n-butyl, 3-methoxypropyl, 2-thienyl, 5-brom-2-thienyl, fenyl, 4-methoxyfenyl nebo 1-piperidyl;

R_4 je vodík;

Z je SO_2 ; a
n je 1.

Sloučeniny vzorce I, které jsou zejména vhodné pro způsoby a prostředky podle předkládaného vynálezu, jsou:

(R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril;
(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-(1-oxobutyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-4-[(5-brom-2-thienyl)sulfonyl]-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-[(4-methoxyfenyl)sulfonyl]-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(fenylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(propylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-4-(butylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(1-piperidylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;
(R)-4-(3-methoxypropylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin; a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Sůl (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu s kyselinou methansulfonovou je zejména vhodná pro způsoby a prostředky podle předkládaného vynálezu.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je anti-proliferativní cytotoxické činidlo vybrané ze skupiny zahrnující paclitaxel, docetaxel, 7-0-methylthiomethyl-paclitaxel,

4-desacetyl-4-methylkarbonatepaclitaxel, 3'-terc.butyl-3'-N-terc.butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3-defenyl-3-N -debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxel, C-4 methylkarbonát paclitaxel, epothilon A, epothilon B, epothilon C, epothilon D, desoxyepothilon A, desoxyepothilon B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo-[14.1.0]heptadekan-5,9-dion a [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-12-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-methyl-ethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo-[14.1.0]heptadekan-5,9-dion, a sloučenina vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

V jiném výhodném provedení je cytotoxickým činidlem paclitaxel a sloučeninou vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

V jiném výhodném provedení je cytotoxickým činidlem [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo-[14.1.0]heptadekan-5,9-dion a sloučeninou vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

Způsoby využívající cytostatické činidlo vybrané ze skupiny zahrnující Iressar, Herceptinr, Tamoxifen a chirurgickou nebo chemickou kastraci jsou zejména výhodné pro použití v kombinovaném způsobu podle předkládaného vynálezu.

Při popisu sloučenin podle předkládaného vynálezu označuje výraz nižší alkyl" nebo nižší alk" (jako součást jiné skupiny) nesubstituovanou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6, výhodně 1 až 4, atomů uhlíku.

Termín "aralkyl" označuje arylovou skupinu navázanou přímo na nižší alkylovou skupinu. Výhodnou aralkylovou skupinou je benzyl.

Termín "aryl" označuje monocyklickou nebo bicyklickou aromatickou uhlovodíkovou skupinu obsahující 6 až 12 atomů uhlíku v kruhové části molekuly. Příklady arylů jsou fenyl, naftyl a bifenyl.

Termín "heterocyklus" označuje plně nasycenou nebo nenasyčenou, aromatickou nebo nearomatickou cyklickou skupinu, která je 4 až 7 členná monocyklická, 7 až 11 členná bicyklická, nebo 10 až 15 členná tricyklická kruhová skupina, která obsahuje alespoň jeden heteroatom v alespoň jednom kruhu obsahujícím atom uhlíku. Každý kruh heterocyklické skupiny obsahující heteroatom může obsahovat 1, 2, 3 nebo 4 heteroatomys vybrané z dusíku, kyslíku nebo síry, kde dusíkové nebo sírové heteroatomy mohou být volitelně také oxidované a dusíkové heteroatomy mohou být také volitelně kvarternizované. Heterocyklická skupina může být vázána v jakémkoliv heteroatomu nebo v atomu uhlíku.

Příklady monocyklických heterocyklických skupin jsou pyrrolidyl, pyrrolyl, indolyl, pyrazolyl, oxetanyl, pyrazolinyl, imidazolyl, imidazolinyl, imidazolidinyl, oxazolyl, oxazolidinyl, isoxazolinyl, isoxazolyl, thiazolyl, thiadiazolyl, thiazolidinyl, isothiazolyl, isothiazolidinyl, furyl, tetrahydrofuryl, thienyl, oxadiazolyl, piperidyl, piperazinyl, 2-oxopiperazinyl, 2-oxopiperidyl, 2-oxopyrrolidinyl, 2-oxazepinyl, azepinyl,

4-piperidonyl, pyridyl, N-oxo-pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, tetrahydrothiopyranyl, tetrahydropyranyl, morfolinyl, thiamorfolinyl, thiamorfolinylsulfoxid, tetrahydrothiopyranylsulfon, thiamorfolinylsulfon, 1,3-dioxolan, tetrahydro-1,1-dioxothienyl, dioxanyl, isothiazolidinyl, thietanyl, thiiranyl, triazinyl, triazolyl, a podobně.

Příklady bicyklických heterocyklických skupin zahrnují benzothiazolyl, benzoxazolyl, benzothienyl, chinoliny, chinoliny-N-oxid, tetrahydroisochinoliny, isochinoliny, benzimidazolyl, benzopyranyl, indoliziny, benzofuryl, chromonyl, kumariny, cinnoliny, chinoxaliny, indazolyl, pyrrolopyridyl, furopyridiny (jako je furo[2,3-c]pyridiny, furo[3,1-bipyridiny nebo furo[2,3-b]pyridiny), dihydroisoindolyl, dihydrochinazoliny (jako je 3,4-dihydro-4-oxo-chinazoliny), benzisothiazolyl, benzisoxazolyl, benzodiaziny, benzofurazany, benzothiopyranyl, benzotriazolyl, benzpyrazolyl, dihydrobenzofuryl, dihydrobenzothienyl, dihydrobenzothiopyranyl, dihydrobenzothiopyraflylsulfon, dihydrobenzopyranyl, indoliny, isochromany, isoindoliny, naftyridiny, ftalaziny, piperony, puriny, pyridopyridyl, chinazoliny, tetrahydrochinoliny, thienofuryl, thienopyridyl, thienothienyl, a podobně.

Když je skupina označena jako volitelně substituovaná, tak může být substituovaná jedním až pěti, výhodně jedním až třemi, substituenty, jako je F, Cl, Br, I, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, hydroxy, nižší alkoxy, cykloalkoxy, heterocyklooxy, oxo, nižší alkanoyl, aryloxy, nižší alkanoyloxy, amino, nižší alkylamino, arylamino, aralkylamino, cykloalkylamino, heterocykloamino, disubstituovaný amin, kde dva amino substituenty jsou nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující nižší alkyl, aryl nebo aralkyl, nižší alkanoylamino, aroylamino,

aralkanoylamino, substituovaný nižší alkanoylamino, substituovaný arylamino, substituovaný aralkylanoylamino, thiol, nižší alkylthio, arylthio, aralkylthio, cykloalkylthio, heterocyklothio, nižší alkylthiono, arylthiono, aralkylthiono, nižší alkytsulfonyl, arylsulfonyl, aralkylsulfonyl, sulfonamid (například, SO_2NH_2), substituovaný sulfonamide, nitro, kyan, karboxy, karbamyl (například, CONH_2), substituovaný karbamyl (například, CONH -nižší alkyl, CONH -aryl, CONH -aralkyl nebo případy, kde jsou dva substituenty na dusíku nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující nižší alkyl, aryl nebo aralkyl), nižší alkoxykarbonyl, aryl, substituovaný aryl, guanidin a heterocykly (například, indolyl, imidazolyl, furyl, thienyl, thiazolyl, pyrrolidyl, pyridyl, pyrimidyl a podobně). Když je výše uvedeno, že substituent je dále substituovaný, tak je substituovaný F, Cl, Br, I, volitelně substituovaným nižším alkylem, hydroxy, volitelně substituovanou nižší alkoxy skupinou, volitelně substituovaným arylem, nebo volitelně substituovaným aralkylem.

Vynález zahrnuje použití všech stereoisomerů sloučeniny vzorce I, buď ve směsi nebo v podstatě čistých formách. Definice sloučeniny vzorce I zahrnuje všechny možné stereoisomery a jejich směsi. Definice sloučeniny vzorce 1 velmi konkrétně zahrnuje racemické formy a izolované optické isomery mající určenou aktivitu.

Sloučeniny vzorce I mohou být připraveny postupy popsány v U.S. 6,011,029. Všechny přihlášky a patenty jsou zde uvedeny jako odkazy.

Sloučeniny vzorce I jsou použitelné v různých formách farmaceuticky přijatelných solí. Termín farmaceuticky přijatelná sůl" označuje ty soli, které budou přijatelné pro farmaceuta, t.j. ty, které jsou v podstatě netoxické a které poskytují

požadované farmakokinetické vlastnosti, chuť, absorpci, distribuci, metabolismus nebo vylučování. Další faktory, praktičtějšího charakteru, jsou také významné, jako je cena surovin, snadnost krystalizace, výtěžek, stabilita, hygroskopicitá a tekutost získaného léku. Výhodně je farmaceutický prostředek připraven z aktivních složek nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí v kombinaci farmaceuticky přijatelnými nosiči.

Mezi farmaceuticky přijatelné soli sloučenin vzorce I, cytotoxických činidel a cytostatických činidel, která jsou vhodná pro použití ve způsobech a prostředcích podle předkládaného vynálezu, patří, například, soli tvořené s různými organickými a anorganickými kyselinami, jako je chlorovodík, kyselina hydroxymethansulfonová, bromovodík, kyselina methanesulfonová, kyselina sírová, kyselina octová, kyselina trifluoroctová, kyselina maleinová, kyselina benzensulfonová, kyselina toluenesulfonová, kyselina sulfamová, kyselina glykolová, kyselina stearová, kyselina mléčná, kyselina jablečná, kyselina pamoová, kyselina sulfanilová, kyselina 2-acetoxybenzoová, kyselina fumarová, kyselina toluenesulfonová, kyselina methanesulfonová, kyselina ethanedisulfonová, kyselina štavelová, kyselina isethionová a různé další farmaceuticky přijatelné soli, jako jsou, například, nitráty, fosfáty, boritany, vinany, citráty, jantarany, benzoáty, askorbáty, salicyláty a podobně. Kationty, jako jsou kvarterní ammoniové ionty, se považují také za farmaceuticky přijatelné protiionty pro anionické skupiny.

Výhodné soli sloučeniny vzorce I jsou hydrochloridové soli, soli kyseliny methansulfonové a soli kyseliny trifluoroctové, kde nejvýhodnější jsou soli kyseliny methansulfonové. Dále, farmaceuticky přijatelné soli sloučeniny vzorce I mohou být tvořeny s alkalickými kovy, jako je sodík, draslík a lithium;

s kovy alkylických zemin, jako je vápník či hořčík;
s organickými bazemi, jako je dicyklohexylamin, tributylamin
a pyridin; a aminokyselinami, jako je arginin, lysin a podobně.

Farmaceuticky přijatelné soli podle předkládaného vynálezu mohou být syntetizovány běžnými chemickými způsoby. Obecně se soli připraví reakcí volné baze nebo kyseliny se stoichiometrickým množstvím nebo s nadbytkem vybrané anorganické nebo organické kyseliny nebo baze vytvářející sůl, ve vhodném rozpouštědle nebo kombinaci rozpouštědel.

Předkládaný vynález také poskytuje farmaceutický prostředek použitelný v léčbu nádorů, který obsahuje terapeuticky účinné množství kombinací podle předkládaného vynálezu, s nebo bez farmaceuticky přijatelných nosičů nebo ředidel. Synergní farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují volitelné anti-proliferativní cytotoxické činidlo nebo činidla, volitelné klidové činidlo, sloučeniny vzorce I a farmaceuticky přijatelný nosič. Způsoby zahrnují použití cytotoxického a/nebo cytostatického činidla v kombinaci s sloučeninami vzorce I. Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou dále obsahovat jedno nebo více farmaceuticky přijatelných pomocných složek, jako je kamenec, stabilizační činidla, antimikrobiální činidla, pufry, barviva činidla, chuťová korigens, adjuvans a podobně. Antineoplastická činidla, volitelně cytostatická činidla (pokud jsou chemickými činidly), sloučeniny vzorce I a prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být podány orálně nebo parenterálně, včetně intravenosního, intramuskulárního, intraperitoneálního, subkutánního, rektálního a lokálního způsobu podání.

Pro orální podání mohou být antineoplastická činidla, cytostatická činidla, sloučeniny vzorce I a prostředky podle

předkládaného vynálezu podány, například, ve formě tablet nebo kapslí, prášků, dispersibilních granulí nebo pastilek, nebo ve formě vodných roztoků nebo suspenzí. V případě tablet pro orální podání patří mezi běžně používané nosiče laktosa, kukuřičný škrob, uhličitan hořečnatý, talek, sacharid, a jako kluzné činidlo se obvykle použije magnesium-stearát. V případě kapslí pro orální podání patří mezi běžně používané nosiče laktosa, kukuřičný škrob, uhličitan hořečnatý, talek a sacharid. Když jsou pro orální podání použity vodné suspenze, tak jsou obvykle přidány emulgační a/nebo suspendační činidla. Dále mohou být do orálních prostředků přidány sladidla a/nebo chuťová korigens. Pro intramuskulární, intraperitoneální, subkutání a intravenosní použití se obvykle použijí sterilní roztoky aktivní složky, a pH roztoků se vhodně upraví a pufruje. Pro intravenosní použití by měla být kontrolována celková koncentrace solutů, aby byl prostředek izotonický. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu jsou sloučeniny vzorce I nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli formulovány pro intravenosní podání se sulfobutylether-7--cyklodextrinem nebo 2-hydroxypropyl-cyklodextrinem.

Pro přípravu čípků podle předkládaného vynálezu se nejprve roztaví vosk s nízkou teplotou tání, jako je směs glyceridů mastných kyselin nebo kakaové máslo, a potom se aktivní složka disperguje homogenně ve vosku, například mísením. Roztavená homogenní směs se potom odlévá do forem vhodné velikosti a nechá se vychladnout, přičemž ztuhne.

Mezi kapalně přípravky patří roztoky, suspenze a emulze. Takovými přípravky jsou například roztoky vody nebo vody/propylenglykolu pro parenterální injekce. Mezi kapalně přípravky patří také roztoky pro intranasální podání.

Aerosolové přípravky přípravky vhodné pro inhalaci zahrnují roztoky a pevné prostředky ve formě prášku, které mohou být v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem, jako je inertní stlačený plyn.

Vynález také zahrnuje pevné přípravky, které jsou určeny pro konverzi na kapalné přípravky pro orální nebo parenterální podání krátce před aplikací. Mezi takové kapalné formy patří roztoky, suspenze a emulze.

Sloučeniny vzorce I, stejně jako cytotoxická a cytostatická činidla, mohou být také aplikovány transdermálně. Transdermální prostředky mohou být ve formě krémů, pleťových vod, aerosolů a/nebo emulzí a mohou být obsaženy v transdermální náplasti v matrici nebo zásobníku, jak je v oboru obvyklé.

Kombinace podle předkládaného vynálezu mohou být také použity s jinými dobře známými způsoby léčby, které jsou účinné pro dané onemocnění.

Pokud jsou formulovány při fixní dávce, tak jsou aktivní složky kombinací podle předkládaného vynálezu použity v dávkách uvedených dále. Alternativně mohou být cytotoxická činidla, cytostatická činidla a sloučeniny vzorce I podány samostatně v dávkách uvedených dále. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je antineoplastické činidlo podáno v dávkách uvedených dále před podáním sloučeniny vzorce I v dávkách uvedených dále.

Tabulka I uvádí výhodné chemoterapeutické kombinace a příklady dávek pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu. Když je uvedena sloučenina vzorce I tak to znamená, v chemoterapeutických kombinacích může být použita jakákoliv varianta sloučeniny vzorce I. Výhodně je použita sloučenina 2.

CHEMOTERAPEUTICKÁ KOMBINACE	Dávka mg/m ² (na dávku)
sloučenina vzorce I + Cisplatina	2,5-750 mg/m ² 5-150 mg/m ²
sloučenina vzorce I + Karboplatina	2,5-750 mg/m ² 5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I + Radiace	2,5-750 mg/m ² 200-8000 cGy
sloučenina vzorce I + CPT-11	2,5-750 mg/m ² 5-400 mg/m ²
sloučenina vzorce I + Paclitaxel	2,5-750 mg/m ² 50-250 mg/m ²
sloučenina vzorce I + Paclitaxel + Karboplatina	2,5-750 mg/m ² 40-250 mg/m ² 5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I + 5-FU a volitelně + leukovorin	2,5-750 mg/m ² 5-5000 mg/m ² 5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I + epothilon	2,5-750 mg/m ² 1-500 mg/m ²
sloučenina vzorce I + gemcitabin	2,5-750 mg/m ² 100-3000 mg/m ²

sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ UFT a volitelně	50-800 mg/m ²
+ leukovorin	5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ gemcitabin	100-3000 mg/m ²
+ cisplatina	5-150 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ UFT	50-800 mg/m ²
+ leukovorin	5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ cisplatina	5-150 mg/m ²
+ paclitaxel	40-250 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ cisplatina	5-150 mg/m ²
+ 5FU	5-5000 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ oxaliplatina	5-200 mg/m ²
+ CPT-11	4-400 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ 5FU	5-5000 mg/m ²
+ CPT-11 a volitelně	4-400 mg/m ²
+ leukovorin	5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ 5FU	5-5000 mg/m ²
+ Radiace	200-8000 cGy

sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ 5FU	5-5000 mg/m ²
+ Radiace	200-8000 cGy
+ cisplatina	5-150 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ oxaliplatina	5-200 mg/m ²
+ 5FU a volitelně	5-5000 mg/m ²
+ leukovorin	5-1000 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ paclitaxel	40-250 mg/m ²
+ CPT-11	4-400 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ paclitaxel	40-250 mg/m ²
+ 5FU	5-5000 mg/m ²
sloučenina vzorce I	2,5-750 mg/m ²
+ UFT	50-800 mg/m ²
+ CPT-11, a volitelně	4-400 mg/m ²
+ leukovorin	5-1000 mg/m ²

Ve výše uvedené tabulce I, 5FU označuje 5-fluoruracil, "leukovorin" může být použit jako leukovorin-kalcium, "UFT" je 1:4 molární poměr tegafur:uracil, a "Epothilon" je výhodně sloučenina popsaná ve WO 99/02514 nebo WO 00/50423, kde oba patenty jsou zde uvedeny jako odkazy.

Tabulka I poskytuje příklady dávek sloučeniny vzorce I a některých protinádorových činidel podle předkládaného vynálezu, ale klinik může podle konkrétních okolností připravit farmaceutický prostředek podle předkládaného vynálezu za použití

jiných vhodných dávek. Například, sloučenina 2, sloučenina vzorce I, může být výhodně podávána v dávkách přibližně 25-500 mg/m² každé tři týdny, po celou dobu léčby. Výhodné dávky pro cisplatinu jsou přibližně 75-120 mg/m² každé tři týdny. Výhodné dávky pro karboplatinu jsou v rozmezí AUC přibližně 200-600 mg/m² nebo AUC přibližně 0,5-8 mg/ml x min.; nejlépe ke AUC přibližně 4-6 mg/ml x mm. Když způsob využívá radiace, tak jsou výhodné dávky v rozmezí přibližně 200-6000 cGy. Výhodné dávky pro CPT-11 jsou přibližně 100-125 mg/m², jednou týdně. Výhodné dávky pro paclitaxel jsou přibližně 130-225 mg/m² každých 21 dnů. Výhodné dávky pro gemcitabine jsou v rozmezí přibližně 80-1500 mg/m² jednou týdně. Výhodně je UFT použit v dávkách přibližně 300-400 mg/m² na den v kombinaci s podáváním leucovorinu. Výhodné dávky pro leucovorin jsou přibližně 10-600 mg/m², jednou týdně.

Skutečné použité dávky se mohou lišit podle požadavků pacienta a závažnosti léčeného stavu. Určení správné dávky pro určitou situaci je snadné pro odborníka v oboru. Obvykle je léčba zahájena menšími dávkami, které jsou nižší než je optimální dávka sloučeniny. Potom se dávky zvyšují po malých krocích, než je dosažen optimální účinek. Pro lepší toleranci může být celková denní dávka rozdělena do dílčích dávek podávaných během dne. Také může být použita intermitentní terapie (například, jeden týden ze tří týdnů nebo tři týdny ze čtyř týdnů).

Některé nádory mohou být účinně léčeny sloučeninami vzorce I a různými protinádorovými činidly. Takové troj- nebo čtyřkombinace mohou mít vyšší účinnost. Při použití takových troj- nebo čtyřkombinací se mohou použít dávky uvedené výše. Další takové kombinace ve výše uvedené tabulce I mohou proto obsahovat "sloučeninu 2" v kombinaci s (1) mitoxantronem + prednisonem; (2) doxorubicinem + taxanem; nebo (3) herceptinem + taxanem. 5-FU může být zaměněno za UFT v jakékoliv z kombinací

uvedených výše.

Při použití způsobů nebo prostředků podle předkládaného vynálezu mohou být také podávána jiná činidla používaná při modulování nádorového růstu nebo metastazování, jako jsou antiemetika.

Také mohou být provedeny klinické studie využívající kombinované chemoterapie podle předkládaného vynálezu. Pro takové studie je zejména výhodné podání přibližně 3-hodinové infuze Taxolur (135 mg/m²), po které následuje přibližně 1 hodinová infuze sloučeniny 2 (50 mg/m²) ve třítydenních intervalech. V jiném protokolu je Taxolr (80 mg/m²) podán infusí během jedné hodiny a potom je podána infuze sloučeniny 2 (80 mg/m²). Tento protokol předpokládá podání jednou týdně. Jiný protokol předpokládá podání trojkombinace obsahující 3-hodinovou infusi Taxolur (135 mg/m²), potom 20-minutovou infusi karboplatiny (AUC = 6), kdy Taxolr a karboplatina jsou podávány tímto způsobem každé tři týdny. V tomto protokolu je sloučenina 2 podávána pacientům jednou týdně během jedné hodiny v dávce 80 mg/m².

Předkládaný vynález poskytuje způsob pro synergní léčbu nádorů, ve kterém jsou cytotoxické činidlo a/nebo cytostatické činidlo a sloučeniny vzorce I podány simultánně nebo sekvenčně. Tedy, zatímco farmaceutický prostředek obsahující antineoplastické činidlo a sloučeninu vzorce I může být vhodný pro podání kombinace v jedné léčbě, předchozí podání cytotoxického nebo cytostatického činidla může být výhodné pro jinou léčbu. Také je třeba si uvědomit, že kombinace antineoplastického činidla a sloučeniny vzorce I podle předkládaného vynálezu může být použita společně s jiným způsobem léčby nádorů, včetně, například, radioterapie a chirurgie. Je třeba si také uvědomit, že cytostatické činidlo

může být také podáno sekvenčně nebo simultánně s jakoukoliv jinou synergní léčbou.

Kombinace podle předkládaného vynálezu mohou být také podány s jinými dobře známými terapeutickými činidly, která jsou vybrána pro svou účinnost při léčbě daného onemocnění. Kombinace podle předkládaného vynálezu být alternativně použity s jinými známými farmaceuticky přijatelnými činidly, když jsou kombinované prostředky nevhodné.

Chemoterapeutická činidla a/nebo radioterapie mohou být aplikovány podle terapeutických protokolů známých v oboru. Odborníkům v oboru bude jasné, že podání chemoterapeutických činidel a/nebo radioterapie závisí na typu léčeného onemocnění a na známých účincích chemoterapeutických činidel a/nebo radioterapie na toto onemocnění. Odborník v oboru také podle toho upraví terapeutické protokoly (například, dávky a doby podání) podle účinků podaných terapeutických činidel (tj. antineoplastických činidel nebo radiace) na pacienta, a podle odpovědi onemocnění na podaná terapeutická činidla. Ve způsobech podle předkládaného vynálezu je sloučenina vzorce I podána simultánně nebo sekvenčně s cytotoxickými činidly a/nebo radioterapií a/nebo cytostatickými činidly. Proto není nutné, aby byly chemoterapeutická činidla a sloučeniny vzorce I, nebo radioterapie a sloučeniny vzorce I, podány simultánně nebo v podstatě simultánně. Výhody simultánního nebo v podstatě simultánního podání jsou odborníkům dobře známé.

Dále, obecně platí, že sloučeniny vzorce I, volitelné cytostatické činidlo a volitelné cytotoxické činidlo nemusí být podány ve stejném farmaceutickém prostředku, a mohou, v důsledku různých fyzikálních a chemických způsobů, být podány různými způsoby. Například, sloučeniny vzorce I mohou být podány orálně

pro dosažení a udržení dostatečných koncentrací v krvi, zatímco chemoterapeutické činidlo může být podáno intravenosně. Výběr způsobu podání a doporučení vhodného způsobu podání, pokud je to možné, tak ve stejném farmaceutickém prostředku, je v rozsahu schopností odborníka v oboru. Prvotní podání může být provedeno podle protokolů známých v oboru, a potom mohou být - podle pozorovaného účinku - dávky, způsoby podání a doby podání upraveny zkušeným lékařem.

Výběr sloučeniny vzorce I a cytotoxického činidla a/nebo radiace a/nebo cytostatického činidla bude záviset na diagnóze ošetřujícího lékaře a na vyhodnocení stavu pacienta a výběru vhodného terapeutického protokolu. Sloučeniny vzorce I a/nebo cytotoxická činidla a/nebo cytostatická činidla a/nebo radiace mohou být podány současně (například, simultánně, v podstatě simultánně nebo ve stejném terapeutickém protokolu) nebo sekvenčně, podle charakteru proliferativního onemocnění, stavu pacienta a výběru chemoterapeutických činidel a/nebo cytostatických činidel a/nebo radiace v kombinaci (tj. v jednom terapeutickém protokolu) se sloučeninami vzorce I.

Když nejsou sloučeniny vzorce I a cytotoxická činidla a/nebo radiace a/nebo cytostatická činidla podána simultánně nebo v podstatě simultánně, tak může být pořadí podání sloučeniny vzorce I a chemoterapeutického činidla a/nebo cytostatického činidla a/nebo radiace různé. Například mohou být sloučeniny vzorce I podány jako první a potom následuje podání cytotoxického činidla a/nebo radiace; nebo mohou být cytotoxická činidla a/nebo radiace podány jako první a potom následuje podání sloučeniny vzorce I. Toto střídavé podávání může být opakováno během jediného terapeutického protokolu. Určení pořadí podání, počtu opakování podání každého terapeutického činidla během terapeutického protokolu je snadné pro odborníka v oboru po

zhodnocení léčeného onemocnění a stavu pacienta. Například může být jako první podáno cytostatické činidlo a/nebo radiace, zejména tehdy, když je použito cytotoxické činidlo. Léčba potom pokračuje podáním sloučeniny vzorce I a volitelně podáváním cytostatického činidla do té doby, než je protokol dokončen.

Tak může ošetřující lékař modifikovat během léčby protokol pro podání složek (terapeutických činidel - tj. sloučeniny vzorce I, cytostatického činidla, cytotoxického činidla nebo radiace) v terapeutickém protokolu podle potřeb jednotlivých pacientů.

Ošetřující lékař bude při hodnocení účinku léčby při podané dávce brát v úvahu celkový stav pacienta, stejně jako jednoznačnější příznaky, jako je zmírnění příznaků asociovaných s onemocněním, inhibice nádorového růstu, skutečné zmenšení nádoru nebo inhibice metastazování. Velikost nádoru může být měřena standardními způsoby, jako jsou radiologické techniky, například CAT nebo MRI scany, a opakování vyšetření může být použito pro hodnocení růstu či dokonce regrese nádoru. Zmírnění příznaků jako je bolest, a zlepšení celkového stavu, může také napomoci v ověření účinnosti léčby.

Pro další pochopení předkládaného vynálezu jsou uvedeny následující příklady, které jsou pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu, který je vymezen pouze připojenými patentovými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Sloučeniny:

Následující označení jsou použita pro identifikaci testovaných sloučenin v příkladech:

Sloučenina 1:

[1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion;

Sloučenina 2:

(R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril, hydrochloridoová sůl;

Sloučenina 3:

(R)-4-(butylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin, hydrochloridová sůl;

Sloučenina 4:

(R)-4-(3-methoxypropylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin, hydrochloridová sůl;

Sloučenina 5:

(R)-4-[(5-brom-2-thienyl)sulfonyl]-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin, hydrochloridová sůl;

Sloučenina 6:

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(1-piperidylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin, hydrochloridová sůl;

Sloučenina 7:

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-[(4-methoxyfenyl)sulfonyl]-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin, hydrochloridová sůl;

Sloučenina 8: 4-(3-bromfenylamino)-6,7-bis(methoxy)chinazolin;

Sloučenina 9: N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]-methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinkarboxamid.

Podání léků:

Pro podání sloučeniny 1 (epothilon) hlodavcům se použily dvě různé přísady: (1) ethanol/voda (1:9, obj./obj.) a (2) Cremophorr/ethanol/voda (1:1:8, obj./obj.). Sloučenina 1 se nejprve rozpustila v ethanolu nebo směsi Cremophorr/ethanol (50:50). Konečné ředění pro aplikaci se připraví dříve než 1 hodinu před aplikací. Pro parenterální podání (iv) se ředění provede vodou tak, že aplikační roztoky obsahují specifické uvedené přísady popsané výše. Pro orální podání (po) se ředění provede 0,25 M fosforečnanem sodným (pufr) (pH=8,0) v poměru 30/70, obj./obj.. Paclitaxel se rozpustí v 50/50 směsi ethanolu a Cremophorur a uskladní se při 40 °C; konečné ředění paclitaxelu se připraví bezprostředně před podáním pomocí 0,9% NaCl. Objem sloučenin podaných injekcí 0,01 ml/g tělesné hmotnosti myši, a 0,005 ml/g tělesné hmotnosti krysy.

Test tvorby kolonií klonogenních buněk

Účinnost, kterou sloučeniny zabíjejí klonogenní nádorové buňky (buňky, které se mohou nekonečně dělit za vzniku kolonií) in vitro, se hodnotí klonogenním testem. Na konci 16 hodinové expozice léku se monovrstva kultivovaných buněk disociuje pomocí 0,05% trypsinu po dobu 5 min při teplotě 37 °C. Buňky se resuspendují v kompletním mediu (obsahujícím 10% FBS), počítají se v Coulter Channelyzer, naředí se a umístí se na plotnu s 5-provedeními na ředění do plastových petriho misek pro kultivaci tkání. Buňky se inkubují ve zvlhčované atmosféře po dobu 10 dnů při teplotě 37 °C. Kolonie buněk se barví krystalickou violetí a ty s >50 buňkami na kolonii se skórují. Určí se koncentrace nutné pro usmrcení 90% klonogenních HCT-116 buněk lidského karcinomu střeva (tj. IC90).

Brd/Urd značení asynchronně rostoucích nádorů:

BrdUrd se rozpustí ve sterilním fosfátem pufrobaném salinickém roztoku (PBS), pH 7,4, a podají se pomalou infusí (24 hodin) ocasní žílou myším v dávce 100 mpk. Myši s nádory se utratí na konci infuze a nádory se excidují pro BrdUrd/DNA analýzu.

Dispergování nádoru a barvení buněk:

Nádory se excidují kleštičkami a disociují se za použití směsi enzymů obsahující 0,025% kolagenasu (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 0,05% pronasu (Calbiochem, LaJolla, CA) a 0,04% DNasu (Sigma) po dobu 1 h při 37 °C. Po odstranění drti se buněčná suspenze protlačí přes 70 m nylonová síta, buňky se promyjí v PBS, spočítají se a resuspendují se v 75% methanolu. Fixované buňky se uchovávají při 4 °C do analýzy.

V den testu se buňky fixované v 75% methanolu se promyjí jednou v PBS, resuspendují se v pepsinu ve 2N HCl (0,2 mg/ml) a inkubují se po dobu 20 min. při 37 °C. Buňky se potom promyjí dvakrát 1 ml PBS obsahujícím 0,5% fetální hovězí sérum (FBS) a 0,5% Tween 80. Po dvou promytích se buňky resuspendují v 1 ml PBS obsahujícím 2% FBS a inkubují se při teplotě místnosti po dobu 20 min. Buňky se potom odstředí a pelety se resuspendují v 100 l anti-BrdUrd-FITC (10 pg/ml) (Boehringer Mannheim). Po 45 min. inkubací se buňky promyjí v 1 ml PBS obsahujícím 0,5% FBS a 0,5% Tween 80. Promyté buňky se resuspendují v 1 ml RNasy (1 mg/ml) a inkubují se po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Nakonec se přidá propidium jodid (Sigma) v koncentraci 10 pg/ml v PBS.

Protinádorové testování in vivo

Lidské nádorové xenotransplantáty se kultivovaly na Balb/c nu/nu holých myších. Nádory se propagovaly jako podkožní transplantáty na vhodném kmenu myší za použití nádorových fragmentů získaných od dárcovských myší.

Počet zvířat dostatečný pro detekování významné odpovědi (6-10) se použil v pokusu a každé myši se podkožně za použití 13-gauge trokaru podkožně implantoval nádorový fragment (50 mg). Pro léčbu nádorů v časném stadiu se zvířata znovu shromáždila před rozdělením do různých terapeutických a kontrolních skupin. Pro léčbu pokročilých nádorů se nádory nechaly narůst na předem určenou velikost (nádory mimo tuto velikost byly vyloučeny) a zvířata se náhodně rozdělila do různých terapeutických a kontrolních skupin. Léčba každého zvířete byla provedena podle tělesné hmotnosti. Léčená zvířata byla denně vyšetřována na známky toxicity/mortality související s léčbou. Každá skupina zvířat byla zvážena před zahájením léčby (hmot.1) a potom po poslední terapeutické dávce (hmot.2). Rozdíl v tělesné hmotnosti (hmot.2-hmot.1) se použil pro měření toxicity související s léčbou.

Odpovědi nádorů se měřily pomocí měření velikosti nádorů kaliperem dvakrát týdně do té doby, než nádory dosáhly předem určené "cílové" velikosti 0,5 nebo 1,0 g. Hmotnosti nádorů (mg) byly vypočteny ze vzorce:

$$\text{hmotnost nádoru} = (\text{délka} \times \text{šířka}^2) / 2$$

Maximální tolerovaná dávka (MTD) je definována jako dávka, při jejímž zvýšení se objeví nadměrná toxicita (t.j. více než jedno úmrtí). MTD je často ekvivalentní optimální dávce (OD). Aktivita je udávána v OD. Myši pošlé před tím, než jejich nádory dosáhly cílové velikosti, se považovaly za pošlé v důsledku

toxicity související s léčbou. Žádné kontrolní myši nepošli dříve, než jejich nádory dosáhly cílové velikosti. Léčebné skupiny s více než jedním úmrtím v důsledku toxicity léku se považovaly za skupiny s nadměrně toxickou léčbou a jejich data nebyla zahrnuta do hodnocení protinádorové účinnosti sloučeniny.

Nádorové odpovědi byly hodnoceny ve smyslu zpomalení růstu nádoru (T-C hodnota), což je definováno jako rozdíl doby (ve dnech) nutné pro dosažení předem určené cílové velikosti pro léčené nádory (T) ve srovnání s kontrolními nádory (C).

Pro hodnocení usmrcování nádorových buněk se nejprve určila doba pro zdvojnásobení objemu nádoru (TVDT) za použití vzorce:

TVDT = Median doby (dny) dosažení cílové velikosti pro kontrolní nádory - Median doby (dny) pro dosažení poloviny cílové velikosti pro kontrolní nádory

a, $\text{Log cell kill (LCK)} = T - C / (3,32 \times \text{TVDT})$

Nádor se považoval za "vyléčený", když nebylo v době ukončení testu detekovatelné onemocnění (Den >75 po implantaci nádoru); interval mezi ukončením pokusu a koncem podávání léků přesahoval 10-krát zdvojovací poločas jakéhokoliv nádoru.

Terapeutické a kontrolní skupiny obvykle obsahovaly 8 myší. Statistické analýzy odpovědí byly provedeny za použití Gehanova generalizovaného Wilcoxonova testu.

Příklad 1: Nádory obsahují jak proliferující, tak neproliferující buněčné populace

Jak nádor roste, tak vývoj cév často nestačí sledovat rychlou

proliferaci populace maligních buněk. Proto mají solidní nádory obvykle abnormální síť krevních kapilár, která neposkytuje nádorovým buňkách adekvátní přívod živi pro optimální růst. Solidní nádory proto obsahují jak proliferující, tak neproliferující nádorové buňky. Ve většině solidních nádorů tvoří nonproliferující nádorové buňky většinu celkové populace nádorových buněk. Současná protinádorová činidla jsou cílena na biochemické procesy proliferujících buněk. Populace neproliferujících nádorových buněk a/nebo stacionárních buněk jsou takovými činidly ovlivněny pouze minimálně. Proto je hlavním faktorem selhání radiace nebo chemoterapie ve vyléčení neoplastických onemocnění neschopnost těchto sloučenin působit na populaci klidových nádorových buněk. V xenotransplantátech HCT116 lidského karcinomu střeva bylo - za použití dlouhodobého (24 h) infusního režimu BrdUrd - stanoveno, že frakce proliferujících buněk v různých nádorech in vivo tvoří pouze malou frakci všech nádorových buněk. Ve 200-300 mg HCT-116 nádoru je pouze přibližně 20% proliferujících buněk a zbývajících 80% jsou neproliferující buňky (Obr. 1). Také byly hodnoceny jiné nádory a v každém případě tvořily neproliferující buňky většinu buněk v nádoru (tabulka 2).

Tabulka 2

Nádor	Histologie	Velikost nádoru (mg)	% prolif.	% neprolif.
HCT116	ca střeva	200-300	20	80
San1	spinocel.ca	200-300	41	59
MDA-Pca-2b	ca prostaty	200-300	35	65
Pat-21	ca prsu	200-300	31	69
San1	spinocel.ca	200-300	44	56

Mikroprostředí s omezenými přísunem živin v solidních nádorech může být in vitro napodobeno kontrolou růstových podmínek kultivačního media. Tak mohou být snížením přívodu živin (v den 8 kultivace) nádorové buňky indukovány do neproliferujícího nebo klidového stavu (stacionární fáze, přibližně 90% neproliferujících buněk), zatímco při optimálních nutričních podmínkách (den 3 kultivace) jsou prakticky všechny nádorové buňky ve exponenciální proliferaci (log fáze, přibližně 90% proliferuje).

Příklad 2: Prostředky podle předkládaného vynálezu selektivně zabíjejí neproliferující nádorové buňky

Účinnost, se kterou sloučenina 2 zabíjí klonogenní nádorové buňky (buňky, které se mohou nekonečně dělit za vzniku kolonií), se in vitro hodnotila klonogenním testem. Na konci 16 hodinové expozice léku se monovrstvy buněk disociovaly působením 0,05% trypsinu po dobu 5 min. při 37 °C. Buňky se resuspendovaly v kompletním mediu (obsahujícím 10% FBS), počítaly se pomocí Coulter Channelyzeru, naředily se a umístily se v 5 provedeních pro jedno ředění do plastových Petriho misek pro kultivaci tkáně. Buňky se inkubovaly v zvlhčované atmosféře po dobu 10 dnů při 37 °C. Buněčné kolonie se barvily krystalovou violetí a kolonie s >50 buňkami na kolonii se skórovaly. Určila se koncentrace potřebná pro usmrcení klonogenních HCT-116 buněk lidského karcinomu střeva o 90% (t.j., IC90).

Sloučenina 2 a analogy selektivně zabíjejí neproliferující (stacionární) HCT116 buňky lidského karcinomu střeva ve srovnání s proliferujícími (Log) buňkami (Obr. 2-4 a Tabulka 3). Rozdíl v sensitivitě mezi proliferující a neproliferující populací je v rozmezí 2,7-181.

Tabulka 3

Sloučenina	IC ₅₀ (uM)		Poměr selektivity pro neproliferující buňky (násobek)
	Stacionární	Log	
Sloučenina 3	0,36	65	181,0
Sloučenina 4	1,05	91,2	86,9
Sloučenina 5	1,08	84,7	78,4
Sloučenina 6	1,04	66,8	64,2
Sloučenina 2	0,96	36,7	44,2
Sloučenina 7	9,6	26	2,7

Většina protinádorových léků ovlivňuje syntézu nebo funkci DNA a proto postihuje proliferující buňky a zanechává klidové buňky intaktní, i když se takové buňky mohou dělit brzy po působení léku. Proto je účinnost protinádorových léčiv často omezena touto refrakterní frakcí nádorových buněk. Například, oproti sloučenině 2, běžně používaná protinádorová činidla, jako je paclitaxel, epothilon B a 5-flourouracil, jsou cytotoxická hlavně pro proliferující nádorové buňky a v podstatě neúčinná na neproliferující buňky (obr. 5 a 6, a tabulka 4).

Tabulka 4

Sloučenina	IC ₅₀ (uM)		Poměr selektivity pro neproliferující buňky (násobek)
	Stacionární	Log	
Paclitaxel	>162 nM	17,8 nM	< 0,1

Epothilon B	>108 nM	1,3 nM	< 0,01
5-fluorouracil	4,6 ug/ml	> 162 ug/ml	< 0,03

Příklad 4 : Antiproliferativní činidla v kombinaci se sloučeninami podle předkládaného vynálezu účinkují synergně v zabíjení nádorových buněk in vitro

Jak bylo uvedeno výše, mechanistické studie jasně naznačují, že sloučenina 2 je selektivně cytotoxická pro neproliferující nádorové buňky. Tento jedinečný rys zvyšuje možnosti synergní kombinované terapie s existujícími protinádorovými činidly, která primárně působí na proliferující nádorové buňky. Například, paclitaxel je značně cytotoxický pro HQT-116 buňky v log fázi in vitro s hodnotou IC₉₀ 17,8 nM (Obr. 5). Nicméně, proti neproliferující stacionární buněčné je zcela netoxický i v koncentraci 162 nM (Obr. 5). Podobný dramatický rozdíl je pozorován pro epothilon B (Obr. 6) s IC₉₀ 1,3 a >108 nM pro proliferující a neproliferující buňky, v příslušném pořadí (tabulka 3). In vitro má kombinace paclitaxelu se sloučeninou 2 synergní cytotoxické účinky takové, že tato kombinace má více než aditivní zabíjení buněk (Obr. 7). Dále bylo zjištěno, že pro dosažení této synergie by měla být dvě činidla podána ve specifické sekvenci. Synergie byla pozorována tehdy, když byly buňky ošetřeny těmito dvěma činidly simultánně nebo když byl paclitaxel podán před sloučeninou 2. Když byla sloučenina 2 podána 24 hodin před paclitaxelem, tak byl pozorován antagonismus. Podobná závislost synergie na sekvenci aplikace byla pozorována pro kombinaci sloučeniny 2 a sloučeniny 1 (obr. 8-10).

Příklad 4: Anti-proliferativní činidla v kombinaci se sloučeninami podle předkládaného vynálezu účinkují synergně v

usmrcování nádorových buněk v xenotransplantátech lidských nádorů

Kombinovaná terapie infusí sloučeniny 2 plus iv bolusem paclitaxelu byla provedena za použití stejného HCT-116 nádorového modelu (Obr. 11). Zatímco jednotlivá činidla podávaná samostatně byla inaktivní (0,4 a 0,6 LCK pro sloučeninu 2 a paclitaxel, v příslušném pořadí), kombinace (sloučenina 2, 125 mpk 24h iv infuse plus paclitaxel, 24 mg/kg iv) vedla k 1,8 LCK, což je synergní účinek.

Kombinovaná chemoterapie sloučeninou 2 a paclitaxelem podaným bolusovým podáním vykazovala také synergii na Pat-7 buňkách lidského ovariálního karcinomu od pacienta s nádorem, u kterého vznikla resistance na TAXOLr. Paclitaxel a sloučenina 2 podané v příslušných maximálních tolerovaných dávkách, vedly k dosažení méně než 1 log zabíjení buněk (LCK) nádoru v tomto modelu resistantního nádoru při léčbě těmito činidly samostatně. Nicméně, kombinace sloučeniny 2 a paclitaxelu v maximálních tolerovaných dávkách vykazovala terapeutickou synergii a signifikantní protinádorovou aktivitu 1,7 LCK (Obr. 12). Synergní protinádorová aktivita byla také pozorována u xenotransplantátů HCT116 lidského karcinomu střeva (Obr. 13). Sloučenina 2, v dávkách, které vyvolávají podobnou systémovou expozici jako u lidských pacientů (20-80 M.hod.), vykazovala synergii s protinádorovým působením paclitaxelu.

Terapeutická synergie byla také jasně demonstrována pro kombinaci sloučeniny 1 a sloučeniny 2 in vivo v xenotransplantátech lidského karcinomu střeva HCT/VM46 s mnohotnou lékovou resistencí. Jak sloučenina 1, tak sloučenina 2 mají střední protinádorovou aktivitu v tomto modelu při samostatném použití (Obr. 13). Obě činidla způsobují více než 1 LCK nádorovou odpověď (1,6 a 1,1 LCK, v příslušném pořadí), ale

neindukují vyléčení nádoru. Nicméně, když byla tato dvě činidla podána v kombinaci (sloučenina 1 a o 24 hodin později sloučenina 2), tak bylo pozorováno dramatické zlepšení protinádorové aktivity. Významné je to, že vysoce signifikantní zvýšení zpomalení nádorového růstu (3,7 LCK), včetně lepšího kurativního účinku, bylo pozorováno u 3 ze 7 myší (Obr. 13).

Byla prokázána závislost této kombinace na sekvenci aplikace. Když byla sloučenina 2 podána 24 hodin před sloučeninou 1, tak nebyla pozorována žádná terapeutická synergie (Obr. 14) a kombinace účinkovala pouze jako sloučenina 1 podaná samostatně.

Příklad 5: Sloučeniny podle předkládaného vynálezu zesilují in vivo protinádorovou aktivitu inhibitoru topoisomerasy I CPT-11 proti lidskému solidnímu karcinomu

CPT-11 je antiproliferativní cytotoxické protinádorové činidlo, které interaguje specificky s enzymem topoisomerasou I, který uvolňuje torsní napětí řetězce DNA indukcí reversibilního zlomu jednoho řetězce. Cytotoxicita CPT-11 je způsobena poškozením obou řetězců DNA vzniklým během syntézy DNA, když replikační enzymy interagují s ternálním komplexem tvořeným topoisomerasou I-DNA, a buď CPT-11, nebo jeho aktivním metabolitem SN-38, Proto působí CPT-11 selektivně na proliferující buňky, které aktivně syntetizují DNA. V tomto příkladu jsme prokázaly, že kombinovaná léčba myší s pokročilými (300-500 mg) xenotransplantáty HCT116 lidského karcinomu střeva CPT-11 1 hodinu před aplikací sloučeniny 2 produkovala synergní protinádorovou aktivitu, která byla mnohem lepší, než když bylo každé z těchto činidel podáno samostatně (obr. 15A a 15B). V této studii byl CPT-11 podán IV v nebo skoro v MTD 30 mg/kg/inj. Sloučenina 2 byla podána ve dvou různých dávkách: 60 a 80 mg/kg/inj, IV. Tyto dávky sloučeniny 2 byly vybrány proto, že

jsou to dávky podobné klinickým dávkám. Jak ukazuje Obr. 15A a 15B, obě dávky sloučeniny 2 v kombinaci s CPT-11, měly signifikantně vyšší protinádorovou aktivitu, než když bylo každé činidlo podáno samostatně. Dále, kombinace produkovala signifikantně více parciálních a kompletních regresí nádoru než při použití těchto činidel samostatně.

Tabulka 5: Protinádorová aktivita kombinované chemoterapie sloučeninou 2 a CPT-11 proti pokročilému HCT116 lidskému karcinomu střeva

Léčba ¹	Dávka (mg/kg/inj)	Odpověď nádoru ²		
		LCK ³	PR (%) ⁴	CR (%) ⁵
CPT-11	30	1,5	50	0
Sloučenina 2	80	1,0	25	0
	60	0,6	0	0
CPT-11 + sloučenina 2	30 + 80	>3,0	100	88
CPT-11 + sloučenina 2	30 + 60	>3,0	100	62

¹ Terapeutické režimy byly IV, Q2D x 5, CPT-22 byl podán 1 hodinu před sloučeninou 2

² Nádory měly hmotnost 300-500 (medián - 200 mg) v době zahájení léčby

³ LCK = Log usmrcování buněk

⁴ PR = Parciální odpověď, redukce velikosti nádoru o 50% nebo více.

⁵ CR = kompletní odpověď, definovaná jako eradikace všech snadno měřitelných nádorů léčbou. Tumor je definován jako neměřitelný, když má méně než 35 mg. Kompletní odpověď se odlišuje od vyléčení v tom, že mohou zůstat mikroskopické nebo okultní

nádory, které mohou způsobit následnou progresi nádoru.

Příklad 6: Sloučeniny podle předkládaného vynálezu zesilují in vivo protinádorovou aktivitu Gemcitabinu (GEMZAR) proti solidní lidským nádorům

Gemcitabin je antiproliferativní cytotoxické chemoterapeutické činidlo typu antimetabolitu, které je specifické pro buněčnou fázi. Činidlo primárně usmrcuje buňky syntetizující DNA (S-fáze) a také blokuje přechod buněk přes G1/S kontrolní bod. Gemcitabin je selektivně toxický proti buňkám, které se aktivně dělí nebo proliferují. Prokázali jsme, že kombinace gemcitabinu se sloučeninou 2 (gemcitabin byl podán 1 hodinu před sloučeninou 2) má zesílenou protinádorovou aktivitu aproti pokročilým xenotransplantátům HT-29 lidského karcinomu střeva na holých myších (obr.16A a 16B). Zesílená protinádorová aktivita byla pozorována nejen ve smyslu zpomalení růstu (LCK), ale - což je důležitější - také vedla k významnému zlepšení stupně odpovědi (regresí nádoru). Kombinace sloučeniny 2 s Gemcitabinem produkovala 100% PR u všech léčených myší, zatímco použití sloučeniny 2 samostatně produkovalo 12,5% PR a gemcitabin samostatně produkoval 0 a 25% odpovědi při dávkách 24 a 6 mg/kg/inj., v příslušném pořadí (obr. 16B).

Příklad 7: Paclitaxel v kombinaci se sloučeninami podle předkládaného vynálezu účinkuje synergně v léčbě xenotransplantátů lidského karcinomu tlustého střeva

Paclitaxel zabíjí nádorové buňky při jejich vstupu do mitotické fáze buněčného cyklu. Proto je paclitaxel selektivně toxický proti proliferujícím buňkám (obr. 5). Prokázali jsme, že kombinace sloučeniny 2 s paclitaxelem má synergní protinádorovou aktivitu v modelu lidského karcinomu střeva, HCT116, na holých

myších. Obr. 17A a 17B ukazují, že iv podání 40 nebo 80 mpk sloučeniny 2 tři hodiny po iv podání paclitaxelu (20 mpk, týdně x 4), produkuje dramatické zlepšení protinádorového účinku každého činidla samostatně; velikost terapeutického zisku značně přesahuje zisk získaný z pouze aditivního protinádorového účinku těchto sloučenin. Tato synergní interakce je pozorována nejen ve zpomalení růstu nádoru, ale také v klinicky relevantnějším měření nádorové odpovědi, konkrétně parciální a kompletní regresi nádoru (nebo odpovědi, PR a CR, v příslušném pořadí) a ve vyléčení nádoru. Toto je ilustrováno v tabulce 6 a na obr. 17C.

Tabulka 6: Protinádorová kombinovaná chemoterapie sloučeninou 2 a paclitaxelem pro pokročilý HCT116 lidský karcinom tlustého střeva

Léčba ¹	Dávka (mg/kg/inj)	Odpověď nádoru ²			
		LCK ³	PR(%) ⁴	CR(%) ⁵	vyléčení(%) ⁶
Paclitaxe	20	2,5	20	0	0
Sloučenina 2	80	1,1	0	0	0
Sloučenina 2	40	0,3	0	0	0
Paclitaxel + sloučenina 2	20 + 80	>3,3	0	100	60
Paclitaxel + sloučenina 2	20 + 60	>3,3	40	30	30

¹ Terapeutické režimy byly IV, Q2D x 5, Paclitaxel byl podán 3 hodiny před sloučeninou 2

² Nádory měly hmotnost 300-500 (medián - 200 mg) v době zahájení léčby

³ LCK = Log usmrcování buněk

⁴ PR = Parciální odpověď, redukce velikosti nádoru o 50% nebo

více.

⁵ CR = kompletní odpověď, definovaná jako eradikace všech snadno měřitelných nádorů léčbou. Tumor je definován jako neměřitelný, když má méně než 35 mg. Kompletní odpověď se odlišuje od vyléčení v tom, že mohou zůstat mikroskopické nebo okultní nádory, které mohou způsobit následnou progresi nádoru.

⁶ Vyléčení - bez viditelných známek onemocnění v den 77 po implantaci nádoru, jak bylo zjištěno při pitvě

Příklad 8: Her-1 inhibitory (sloučenina 8) v kombinaci se sloučeninami podle předkládaného vynálezu účinkují synergně v usmrcování SAL-2 nádorových buněk in vitro a A431 spinocelulárního karcinomu in vivo

Vliv receptoru pro epidermální růstový faktor (EGF, nebo Her-1) se u člověka předpokládá u mnoha epitelových a spinocelulárních karcinomů. Vazba EGF na jeho receptory v nádorových buňkách vede k aktivaci tyrosinkinasové aktivity receptoru a autofosforylaci tyrosinu. Tyto děje potom vedou k aktivaci kaskády biochemických dějů, které se podílejí na přenosu mitogenních (proliferčních) signálů v nádorových buňkách. Inhibice vazby EGF receptoru vedla v sensitivních buňkách k inhibici proliferace buněk, arestu buněčného cyklu a apoptose. Proto EGF nebo Her-1 inhibitory selektivně působí na proliferující buňky a interferencí s přenosem mitogenních signálů činí z nádorových buněk buňky neproliferující. Vzhledem k selektivitě sloučenin podle předkládaného vynálezu, které působí na neproliferující buňky, jsme navrhli použití tohoto způsobu účinku Her-1 inhibitorů, který dělá z nádorových buněk buňky neproliferující, což je "sensibilizuje" na pro-apoptotickou aktivitu sloučenin 2 a podobných sloučenin podle předkládaného vynálezu. Tato hypotéza byla ověřena jako pravdivá jak in vitro, tak in vivo. Pro in vitro testy se pro hodnocení

terapeutické účinnosti kombinace Her-1 inhibitoru se sloučeninou 2 provedly pokusy využívající SAL-2 nádorových buněk, které konstitutivně nadměrně exprimují Her-1 receptory. Pro tento účel se použil Her-1 inhibitor, sloučenina 8. Jako referenční činidlo se použil paclitaxel jako příklad činidla, které působí pouze na proliferující buňky a, v souladu s naší hypotézou, nepůsobí dobře v použitých experimentálních podmínkách, t.j. použila se následující sekvence: Her-1 inhibitor jako první pro indukci stázy buněk, a potom sloučenina 2 nebo paclitaxel. Data ukázala, že exponenciálně rostoucí SAL2 nádorové buňky jsou relativně resistantní na sloučeninu 2 a paclitaxel, když je každé činidlo podáno samostatně, jak je uvedeno na obr. 18A-18G. Sekvenční kombinace Her-1 inhibitoru '832, po kterém následovalo podání paclitaxelu, byla antagonistická, jak předpokládala naše hypotéza (Obr. 18C). Naopak, sekvenční kombinace Her-1 inhibitoru (sloučeniny 8) a potom sloučeniny 2 byla synergní (Obr. 18D).

Pro prokázání účinků kombinace Her-1 inhibitoru se sloučeninami podle předkládaného vynálezu in vivo jsme použily Her-1 inhibitor Iressa^R v kombinaci se sloučeninou 2 pro léčbu lidského spinocelulárního karcinomu, A431, o kterém je známo, že nadměrně exprimuje Her-1 receptor. Jak je uvedeno na obr. 18E a F, dvě separátní dávky sloučeniny 2 použité v kombinaci s Iressou, produkovaly zesílenou protinádorovou aktivitu ve srovnání s každým z těchto čindél použitým samostatně. Je třeba uvést, že Iressa^R byla podávána denně, Q1D x 11, a tato léčba byla zahájena 3 dny před zahájením léčby sloučeninou 2. Sloučenina 2 byla podávána v režimu Q2D x 5. Významné je to, že sekvenční léčba (t.j. Iressa jako první) účinkovala špatně s paclitaxelem (Obr. 18G). Kombinace Iressa^R a paclitaxelu měla protinádorové účinky, které nebyly lepší, než když bylo každé činidlo podáváno samostatně.

Příklad 9: Kombinace sloučeniny 2 s protilátkou proti Her-2 Herceptinem má synergní inhibiční účinky na růst Her-2 nadměrně exprimujících buněk lidského karcinomu prsu

HER-2 (nebo c-erbB2) proto-onkogen koduje transmembránový receptorový protein velikosti 185 kDa, který je strukturálně příbuzný s receptorem pro epidermální růstový faktor, neboli Her-1. Nadměrná exprese HER2 protein je pozorována u 25%-30% primárních karcinomů prsu. Herceptin^r je rekombinantní od DNA odvozená humanizovaná monoklonální protilátka, která se selektivně váže na extracelulární doménu Her-2 proteinu. Bylo prokázáno, že Herceptin^r v testech in vitro a na zvířatech, inhibuje proliferaci lidských nádorových buněk, které nadměrně exprimují Her-2. Proto podle předkládaného vynálezu je Herceptin^r příkladem činidla, které činí z nádorových buněk neproliferující buňky a tak senzibilizuje nádorové buňky na protinádorové účinky sloučenin podle předkládaného vynálezu, které selektivně působí na neproliferující buňky. Proto mělo v tomto příkladu předcházející ošetření buněčné linie lidského karcinomu prsu BT-474, která nadměrně exprimuje Her-2, po dobu 2 dnů před ošetřením sloučeninou 2, synergní antiproliferativní účinek na růst nádorových buněk (Obr. 19).

Příklad 10: Tamoxifen v kombinaci se sloučeninami podle předkládaného vynálezu účinkuje synergně v usmrcování nádorových buněk v estrogen-dependentních xenotransplantátech lidského karcinomu prsu

Většina lidských karcinomů prsu vyžaduje pro svůj růst a progresi estrogeny (estrogen-dependentní nádory). Léčba estrogen-dependentních karcinomů prsu antiestrogeny, jako je tamoxifen, inhibuje proliferaci nádorových buněk jak in vitro, tak in vivo. Pro hodnocení účinnosti kombinovaných

protinádorových činidel podle předkládaného vynálezu v modelu lidského karcinomu prsu, MCF-7, byly xenotransplantáty kultivovány na holých myších a léčeny popsáním způsobem. Kombinovaná chemoterapie za použití sloučeniny 2 a tamoxifenu měla zesílenou protinádorovou aktivitu. Dále, remise nádoru byla pozorována u 3 z 8 myší v xenotransplantátech MCF-7 lidského karcinomu prsu. Obr. 20 ukazujem že sloučenina 2 podaná jako jediné činidlo produkuje pouze velmi slabý účinek na růst nádoru. Tamoxifen samostatně byl v tomto modelu výrazně více aktivní, zhruba jako účinkek odstranění estrogenových pelet, ale po léčbě tamoxifenem nebo přidání pelet nádory opět rostly a nebylo pozorováno žádné vyléčení. Naopak, 40 mpk tamoxifenu v kombinaci se sloučeninou 2 (po, 100 mpk, qdx10, dvě série) vedla k dramatickému snížení mediánu hmotnosti nádoru, kromě výše uvedených vyléčení.

Příklad 11: Androgen-ablační terapie (chirurgická nebo chemická) zesiluje sensitivitu androgen-dependentního lidského karcinomu prostaty na sloučeninu 2 indukci neproliferativního stavu v nádorových buňkách (klidového stavu)

Jak bylo uvedeno výše, buňky se stávají neproliferujícími neboli "klidovými" za různých biologických podmínek. Jedním běžným postupem pro léčbu lidského karcinomu prostaty je chemická kastrace. Ačkoliv není vynález vázán na jeden určitý mechanismus, předpokládá se, že u androgen-dependentního karcinomu prostaty působí hormonální ablace jako protiproliferativní činidlo tím, že odstraňuje růstové stimuly zásadní pro proliferaci nádoru. Účinnost protinádorových činidel podle předkládaného vynálezu byla proto hodnocena v modelu xenotransplantátů lidského karcinomu prostaty.

V androgen-dependentních podkožních xenotransplantátech

MDA-Pca-2b lidského karcinomu prostaty měla léčba sloučeninou 2 samostatně (400 mpk, po, qldxl0) mírný účinek na růst nádoru, jak je uvedeno na obr. 21. Androgenní ablace (chirurgická kastrace) také snižovala růst nádoru, ale nezpůsobovala regresi. Jak data ukázala (Obr. 21), vedlo podání sloučeniny 2 tři dny po kastraci k rychlé regresi nádoru.

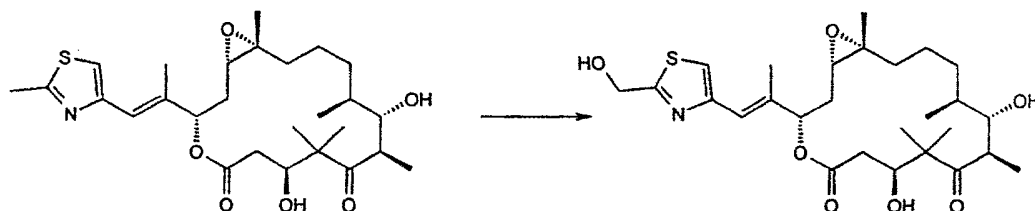
Jiným způsobem indukce neproliferativního stavu v androgen-dependentních buňkách karcinomu prostaty je použití anti-androgenního činidla, jako je Casodexr. Kromě toho je nyní známo, že některé karcinomy prostaty zůstávají sensitivní na terapii Casodexemr i poté, co se stávají androgen-independentními, a naopak. Tento fenomén je předpokládáně důsledkem specifických mutací v androgenním receptoru, které různě ovlivňují vazbu androgenu a receptoru pro androgen. Pro testování protinádorové účinnosti Casodexur a sloučeniny 2 jsme použily Casodexr-responsivní, ale androgen-independentní model lidského karcinomu prostaty, model Pca-2b-AI. Jak je uvedeno na obr. 22, kombinované účinky Casodexur a sloučeniny 2 byly v tomto modelu významně vyšší než účinky každého činidla použitého samostatně, když byla obě činidla podána v maximálních tolerovaných dávkách a režimech (600 mpk, po, qld xl0 pro sloučeninu 2; 150 mpk, po, Qld x 4 pro Casodexr, v příslušném pořadí). Tak kombinace Casodexur a sloučeniny 2 měla synergní protinádorovou aktivitu, která byla vyšší než když bylo každé činidlo podáno samostatně.

Příklad 12: Sloučenina 2 v kombinaci s cdk inhibitorem (sloučeninou 9) má synergní účinky v zabíjení buněk, které jsou závislé na sekvenci podání (Obr. 23)

Mitotické dělení savčích buněk vyžaduje koordinovanou aktivitu rodiny serin/threonin protein kines, které se označují jako

cyklin-dependentní kinasy (CDK). Inhibitory CDK, přesněji CDK2, inhibují buněčnou proliferaci a zastavují růst buněk v G1/S přechodu. Pro určení účinků kombinované chemoterapie CDK inhibitorem (CDKI) a sloučeninou podle předkládaného vynálezu se provedl pokus, ve kterém byly exponenciálně proliferující A2780s buňky lidského karcinomu ovarii léčeny po dobu 4 hodin 1,5 uM selektivního CDK2 inhibitoru. Sloučeninu 9 (dávka nemající účinek) byla kombinována s 20 hodinovou léčbou stoupající koncentrací sloučeniny 2. Byly použity dvě sekvence léčby: (I) sloučenina 9 během 4 hodin a potom sloučenina 2 během 20 hodin, nebo (2) sloučenina 2 po dobu 20 hodin a potom sloučenina 9 po dobu 4 hodin. Jak je uvedeno obr. 23, synergní zabíjení buněk bylo pozorováno tehdy, když byl CDKI podán jako první, zatímco žádné účinky nebyly pozorovány tehdy, když byla sloučenina 2 podána jako první. Toto podporuje hypotézu, že při podání CDKI jako prvního činidla se buňky stávají neproliferujícími, což je senzibilizuje pro cytotoxické účinky sloučeniny 2.

Příklad 13: Konverze Epothilonu B na Epothilon F



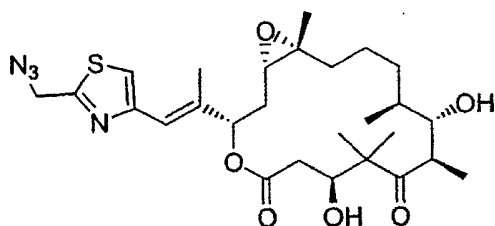
(i) 1,98 g (3,90 mmol) Epothilonu B se vloží pod atmosféru argonu a rozpustí se v 60 ml suchého CH_2Cl_2 . Do tohoto roztoku se přidá 0,720g mCPBA (4,17 mmol, 1,07 ekvivalentů). Směs se mísí při teplotě 25 °C po dobu 5,5 hodiny. Reakční směs se utlumí 60 ml NaHCO_3 a extrahuje se 3x75 ml CHCl_3 . Organická fáze se promyje 100 ml vody a potom 70 ml 5% Na_2SO_3 (aq.) a potom

70 ml solanky. Organická fáze se potom suší přes Na_2SO_4 . Surový reakční produkt se zpracuje chromatografií za použití silikagelu eluovaného 2% MeOH v CHCl_3 za zisku 0,976 g N-oxidu (48%) ve formě bílé vločkovité pevné látky.

(ii) Do zkumavky se zátkou pod atmosféru argonu se přidá 0,976 g N-oxidu (1,86 mmol), který se rozpustí v 35 ml suchého CH_2Cl_2 , 2,6-lutidinu (1,73 ml, 14,88 mmol, 8 ekvivalentů) a $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ (1,84 ml, 13,02 mmol, 7 ekvivalentů). Zkumavka se uzavře a zahřívá se při 70 °C po dobu 25 min. Směs se nechá vychladnout a rozpouštědlo se odstraní pod proudem argonu a potom se směs ve vakuu koncentruje na několik ml tmavě žlutého roztoku. Reakční směs se naředí 25 ml MeOH a přidá se 2,9 ml 28% NH_4OH (aq.). Směs se zahřívá při 45 °C po dobu 20 min., a potom se ochladí na teplotu místnosti. Surový produkt se zahustí na rotační odparce a zpracuje se chromatografií za použití silikagelu eluovaného 4% MeOH v CHCl_3 za zisku 0,815 g Epothilonu F (84%).

Příklad 14

Příprava (1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*-3-2-2-(azidomethyl)-4-thiazolyl]-1-methylethenyl-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyclo[14,1.1]heptadkan-5,9-dionu



Do míseného roztoku epothilonu F z příkladu 13 (957 mg, 1,83 mmol) v 20,0 ml tetrahydrofuranu při teplotě 0 °C pod atmosféru argonu se přidá 0,47 ml difenylfosforylazu (604 mg, 2,19 mmol, 1,2 ekvivalenty). Směs se mísí po dobu přibližně 3 min. Potom se

přidá 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en (0,27 ml, 278 mg, 1,83 mmol, 1 ekvivalent) a směs se mísí při teplotě 0 °C. Po 2 hodinách se směs zahřeje na 25 °C a mísí se po dobu 20 hodin. Reakční směs se naředí 150 ml ethylacetátu a promyje se 50 ml H₂O. Vodná vrstva se extrahuje 35 ml ethylacetátu. Kombinované organické vrstvy se suší přes Na₂SO₄ a zahustí se ve vakuu. Surový materiál se zpracuje chromatografií za použití silikagelu eluovaného 50% ethylacetátem v hexanech za zisku 913 mg (91%) 21-azido-epothilonu B ve formě čirého, bezbarvého oleje. MS (ESI+): 549,3 (M+H)+; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃); delta = 6,59 (bs, 17-H), 7,04 (s, 19-H), 4,63 (s, 21-H₂); HRMS (DCI); C₂₇H₄₀N₄O₆S: [M⁺] vypočteno 549,2747, zjištěno 549,2768.

Příklad 15

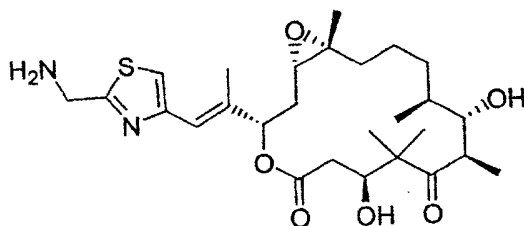
Příprava 1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*-3-2-2-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-methylethenyl-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo[14,1.1]heptadkan-5,9-dionu

Lindlarův katalyzátor, 18,0 mg, se suspenduje v 500 l ethanolu v atmosféře H₂ a suspenze se nasytí. Potom se přidá 15,9 mg (29,0 mmol) 21-azido-epothilonu B z příkladu 14 rozpuštěného ve směsi ethanol-methanol. Po mísení po dobu 30 minut při teplotě místnosti se suspenze přefiltruje přes infuziorovou zeminu a promyje se ethylacetátem. Rozpouštědlo se odstraní z organické fáze a suší se ve vysokém vakuu. Přečištění surového produktu se provede pomocí PSC (rozpouštědlo: CH₂Cl₂/methanol 90:10), a získá se 12,3 mg (81%) 21-amino-epothilonu B a 1 mg (6%) eduktu.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃); delta = 6,58 (bs, 17-H), 7,05 (s, 19-H), 4,15 (s, 21-H₂); HRMS (DCI); C₂₇H₄₂N₂O₆S: [M+H⁺] vypočteno 522,2764, zjištěno 522,2772.

Příklad 16

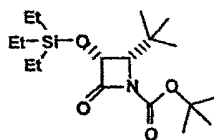
Příprava 1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*-3-2-2-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-methylethenyl-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo[14,1.1]heptadkan-5,9-dionu (alternativní způsob)



Do míseného roztoku 21-azido-epothilonu B (příklad 14) (1,070 g, 1,950 mmol) v 30,0 ml tetrahydrofuranu pod atmosféru argonu se přidá 0,22 ml trimethylfosfinu (0,163 g, 2,145 mmol, 1,1 ekvivalenty). Potom se přidá H_2O (5,5 ml) a směs se mísí při teplotě 25 °C. Po 3 hodinách se azid zcela spotřebuje a přidají se 3 ml 28% vodného NH_4OH pro dokončení konverze fosforyl iminu na amin. Po mísení při 25°C po dobu 1 hodiny se rozpouštědla odstraní ve vakuu. Surový materiál se zpracuje chromatografií za použití silikagelu eluovaného 1% Et_3N , 2,5% MeOH v $CHCl_3$, za zisku 924 mg (91%) 21-amino-epothilonu B ve formě bílé pevné látky. MS (ESI): 523,3 (M+H).

Příklad 17

Příprava (+)-cis-4-terc.butyl-1-terc.butyloxykarbonyl-3-triethylsilyloxy-azetidin-2-onu



Trimethylacetaldehyd (20,3 ml, 1,25 ekv) se přidá do mísené suspenze p-anisidinu (18,4 g, 0,150 mol) a bezvodého Na_2SO_4 (150 gin) v bezvodém dichloromethanu (250 ml) při teplotě místnosti.

Po 2 hodinách se tato směs přefiltruje a pevná látka se promyje dalším bezvodým dichloromethanem. Rozpouštědlo se odstraní z filtrátu a krystalický zbytek se rozpustí v bezvodém dichloromethanu (750 ml) a umístí se pod atmosféru dusíku. Přidá se triethylamin (48,0 ml, 2,3 ekv) a reakční směs se ochladí na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po kapkách se přidá benzyloxyacetylchlorid (27,2 ml, 1,15 ekv) a potom se reakční směs nechá zahřát na teplotu místnosti. Po 24 hodinách se tato směs promyje 0,5 M HCl (dvakrát), nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 , solankou a suší se (Na_2SO_4). Rozpouštědlo se odstraní a zbytek se zpracuje chromatografií na silikagelové koloně (gradientová eluce 20% dichloromethanem v hexanu obsahujícím 0 až 20% EtOAc) za zisku (+/-)-cis-4-terc.butyl-3-benzyloxy-1-p-methoxybenzyl-azetidinonu ve formě krystalické pevné látky (46,9 g, 92%): ^1H NMR (CDCl_3) δ = 1,09 (s, 9H), 3,81 (s, 3H), 4,15 (d, 1H, $J=5,5\text{ Hz}$), 4,77 (d, 1H, $J=11,9\text{ Hz}$), 4,81 (d, 1H, $J=5,5\text{ Hz}$), 5,03 (d, 1H, $J=11,9\text{ Hz}$), 6,87-7,43 (m, 9H); LRMS (ESI) 340 ($[\text{M}+\text{H}^+]$). Roztok dusičnanu ceričito-amonného (60,4 g, 3,6 ekv.) v 900 ml vody se přidá do dobře míseného roztoku azetidinonu (10,38 g, 30,6 mmol) v acetonitrilu (600 ml) v ledové lázni během 1 hodiny. Reakční směs se potom extrahuje EtOAc (dvakrát) a kombinované organické extrakty se promyjí nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 (dvakrát), 20% vodným roztokem NaHSO_3 , nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 a solankou. Po sušení (Na_2SO_4) se rozpouštědla odstraní a zbytek se zpracuje chromatografií na silikagelové koloně (gradientová eluce hexany obsahujícími 10 až 40% EtOAc) za zisku 5,64 g mírně nečistého impure (+)-cis-3-benzyloxy-4-terc.butyl-1-azetidin-2-onu. ^1H NMR (CDCl_3) 1,04 (s, 9H), 3,51 (d, 1H, $J=5,2\text{ Hz}$), 4,71 (m, 2H), 4,96 (d, 1H, $J=11,9\text{ Hz}$), 6,10 (brs, 1H), 7,35 (m, 5H). Suspenze tohoto materiálu (5,54 g, 23,8 mmol) a 2,5 g 10% Pd na uhlíku v absolutním EtOH (100 ml) se hydrogenuje (34 psi H_2 , Parrův přístroj) po dobu 23 hodin. Přidají se další 2 g Pd katalyzátoru

a hydrogenace pokračuje po dobu dalších 17 hodin při 50 psi H₂. Katalyzátor se odstraní filtrací a rozpouštědlo se odstraní z filtrátu za zisku surového

(+)-cis-3-hydroxy-4-(terc.butyl)-azetidin-2-onu: ¹H NMR (CDCl₃ + 1 kapka D₂O) 1,05 (s, 9H), 3,48 (d, 1H, J=5,0 Hz), 4,98 (d, 1H, J=5,0 Hz). Tento materiál se rozpustí v suchém

N,N-dimethylformamidu (40 ml) a přidá se imidazol (3,24 g, 2 ekv.) a triethylsilylchlorid (4,0 ml, 1 ekv.). Po 10 min, se reakční směs rozdělí mezi vodu a směs EtOAc a hexanu (1:1).

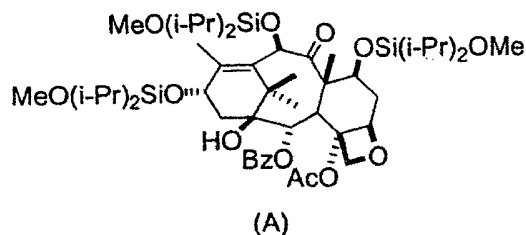
Organická fáze se promyje vodou (dvakrát), solankou a potom se suší (Na₂SO₄). Rozpouštědla se odstraní a zbytek se zpracuje

chromatografií na silikagelové koloně (gradientová eluce 20 až 25% EtOAc v hexanu) za zisku (+)-cis-4-terc.butyl-3-

triethylsilyloxy-azetidin-2-onu (3,86 g): ¹H NMR (CDCl₃) delta 0,70 (m, 6H), 0,98 (m, 18H), 3,39 (d, 1H, J=5,0 Hz), 4,88 (dd, 1H, J = 2,1, 5,0 Hz), 6,08 (brs, 1H). Roztok tohoto azetidinonu (2,04 g, 7,92 mmol), diisopropylethylaminu (1,66 ml, 1,2 ekv), di-terc.butyldikarbonátu (1,90 g, 1,1 ekv.)

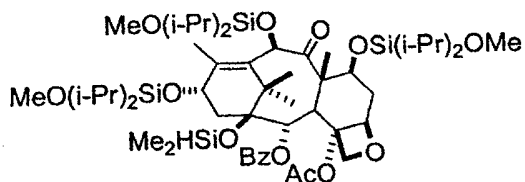
a p-dimethylaminopyridinu (194 mg, 0,2 ekv.) v suchém dichloromethanu (24 ml) se mísí při teplotě místnosti po dobu 3 hodin. Reakční směs se naředí dichloromethanem, promyje se solankou a suší se (Na₂SO₄). Odstranění rozpouštědla a potom chromatografie na silikagelové koloně (gradientová eluce 0 až 20% EtOAc v hexanu) vede k zisku 2,71 g (96%) titulní sloučeniny ve formě oleje: ¹H NMR (CDCl₃) delta 0,70 (m, 6H), 1,00 (m, 9H), 1,09 (s, 9H), 1,53 (s, 9H), 3,90 (d, 1H, J = 6,5 Hz), 4,93 (d, 1H, J = 6,5 Hz).

Příklad 18: Příprava baccatinového derivátu A



Do roztoku 10-desacetylbaecatinu (47,4 g, 87 mmol) v bezvodém N,N-dimethylformamidu (DMF) (500 ml) se při teplotě místnosti přidá imidazol (47 g, 691 mmol). Roztok se mísí po dobu 10-15 minut do té doby, než se získá čirý roztok. Po kapkách se do reakční směsi přidá diisopropyldichlorosilan (58 ml, 322 mmol). Reakční směs se mísí po dobu 16 hodin při teplotě místnosti. Do roztoku se přidá další dávka diisopropyldichlorosilanu (6 ml) a reakční směs se mísí po dobu 60 minut. HPLC v tuto dobu ukáže dokončení reakce. Do směsi se přidá methanol (36 ml) a roztok se mísí po dobu 60 minut. Reakce se ukončí naředěním směsí terc.butylmethylketonu (TBME) (500 ml) a vody (200 ml). Vrstvy se separují a organická fáze se promyje solankou (250 ml), suší se (síran sodný) a odpaří se za zisku trisilylovaného baecatinového derivátu A, (91 g, >100% výtěžek) ve formě bílé amorfnní sloučeniny, která se použije v dalším stupni bez dalšího přečištění. LRMS (ESI) M^+ vypočteno pro $C_{50}H_{84}O_{13}Si_3$: 977. Zjištěno 977.

Příklad 19: Příprava baecatinového derivátu B

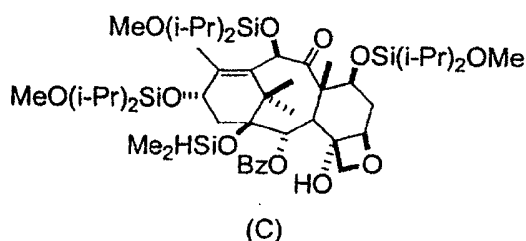


(B) Do roztoku baecatinového derivátu A (90 g, 92 mmol) v DMF (500 ml) se přidá imidazol (22 g, 320 mmol) při teplotě 0 °C. Dimethylchlorsilan (35 ml, 320 mmol) se přidá po kapkách při teplotě 0 °C. V tuto chvíli se pozoruje srážení sloučeniny. Reakční směs (kaše) se mísí po dobu 0,5 h při teplotě 0 °C. Pevný materiál se přefiltruje a promyje se chladným DMF (3X150 ml). Po sušení vzduchem se pevný materiál rozpustí v TBME (700

ml) a roztok se promyje vodou (3 X 200 ml), solankou (250 ml) a suší se (síran sodný). Roztok se přefiltruje přes tenkou vrstvu oxidu křemičitého. Odstraněním rozpouštědla ve vakuu se získá sloučenina B s výtěžkem 77% (70 g).

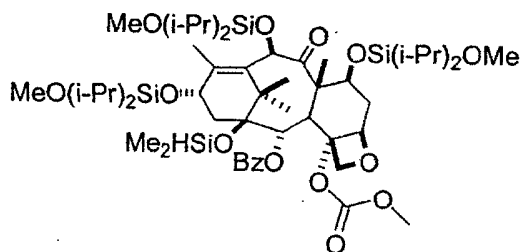
LRMS(ESI) M^+ vypočteno pro $C_{50}H_{90}O_{13}Si_4$: 1035. Zjištěno 1035.

Příklad 20: Příprava baccatinového derivátu C



Do míseného roztoku B (66,3 g, 64 mmol) v toluenu (680 ml) při teplotě $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ se po kapkách během 10 minut přidá Red-Alr (50 ml, 160 mmol, 65 hmot.% roztok hydridu sodno-bis(2-methoxyethoxy)hlinitého v toluenu). Reakční směs se zahřeje na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a mísí se po dobu 1,5 hodiny. Do reakční směsi se po kapkách přidá methanol (62 ml) za udržování vnitřní teploty mezi -20 a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Roztok se naředí TBME (500 ml) a potom se přidá 1N roztok hydroxidu sodného (60 ml) a solanka (60 ml). Roztok se mísí po dobu 30 minut. Do směsi se přidá infuziorová zemina (12 g), směs se mísí po dobu 10 minut a filtruje se přes vrstvu infuziorové zeminy. Vrstvy se separují. Organická vrstva se promyje vodou, solankou a suší se (síran sodný). Potom se roztok přefiltruje přes tenkou vrstvu oxidu křemičitého před tím, než se odstraní rozpouštědlo. Sloučenina se získá s výtěžkem 97% (62 g) ve formě bílé pevné látky. LRMS(ESI) M^+ vypočteno. For $C_{50}H_{88}O_{12}Si_4$: 993. Zjištěno 993.

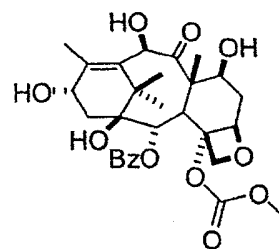
Příklad 21: Příprava baccatinového derivátu D



(D)

Pod atmosféru argonu se do roztoku baccatinového derivátu C (62 g, 62 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (THF) (600 ml) při teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ přidá po kapkách lithium-bis(trimethylsilyl)amid (125 ml, 125 mmol, 1 M roztok v THF). Roztok se mísí po dobu 15 minut a potom se přidá methylchlorformiát (9 ml, 116 mmol); vnitřní teplota roztoku se udržuje na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakční směs se pomalu ohřeje na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a směs se mísí po dobu 3 h. Po dokončení reakce se přidá nasycený roztok chloridu amonného (300 ml). Reakční směs se extrahuje TBME (100 ml). Organická vrstva se promyje nasyceným roztokem chloridu amonného (200 ml), vodou (200 ml), solankou (200 ml), suší se (síran sodný) a odpaří se za zisku sloučeniny D ve formě oleje (67 g, $>100\%$). Surový materiál se použije v dalším stupni bez dalšího přečištění. LRMS(ESI) M^+ vypočteno pro $\text{C}_{52}\text{H}_{90}\text{O}_{14}\text{Si}_4$: 1051. Zjištěno 1051.

Příklad 22: Příprava baccatinového derivátu E



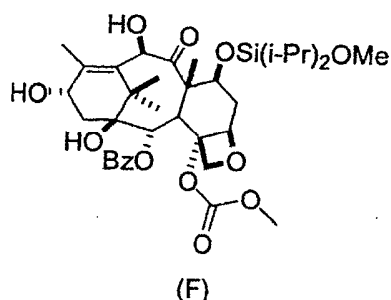
(E)

Do roztoku baccatinového derivátu D (62 g, 59 mmol) v suchém THF (260 ml) se přidá komplex triethylamin-kyselina fluorovodíková (56 ml, 344 mmol), při teplotě místnosti. Reakční směs se mísí po dobu 3 hodin. Reakční směs se naředí ethylacetátem (350 ml) a promyje se vodou (200 ml), solankou

(200 ml), suší se (síran sodný) a odpaří se za zisku sloučeniny E (43 g, >100% surový výtěžek). Opětovným rozetřením surové sloučeniny ve směsi horkého ethylacetátu (350 ml) a hexanů (50 ml) se získá čistá sloučenina E s výtěžkem 90%.

LRMS(ESI) M^+ vypočteno pro $C_{29}H_{36}O_{11}$: 560. Zjištěno 560.

Příklad 23: Příprava baccatinového derivátu E

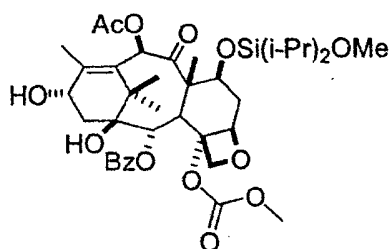


Do míseného roztoku baccatinového derivátu E (32 g, 57 mmol) a imidazolu (11,7 g, 172 mmol v DMF (220 ml)) při teplotě -65°C se přidá diisopropyldichlorsilan (26,8 ml), pod atmosféru argonu. Teplota reakční směsi se udržuje -60°C a směs se mísí po dobu 2 hodin. Po dokončení reakce (HPLC) se přidá roztok imidazolu v methanolu (11,7 g imidazolu se rozpustí v 35 ml methanolu) a roztok se mísí při teplotě 0°C po dobu 30 minut. Směs se extrahuje TBME (500 ml). Organická fáze se promyje vodou (4x150 ml), suší se (síran sodný) a odpaří se za zisku surové sloučeniny F (45 g). Surový materiál se dále rozpustí v acetonitrilu (150 ml) a roztok se promyje hexany (3X100 ml.). Odstraněním acetonitrilu se získá čistá sloučenina F ve formě bílé pevné látky (34 g, 84% výtěžek).

LRMS(ESI) M^+ vypočteno pro $C_{36}H_{52}O_{12}Si$: 704. Zjištěno 704.

Příklad 24:

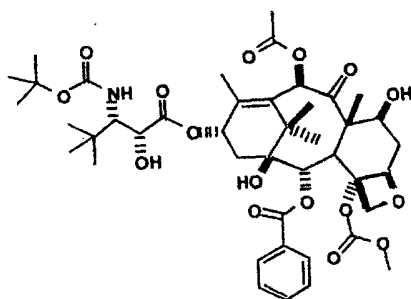
Příprava 4-deacetyl-7-[bisisopropyl-(methoxy)-silyloxy]-4-methoxykarbonyl-baccatinu



Do roztoku baccatinového derivátu F (33,2 g, 47 mmol) v DMF (200 ml) se po kapkách přidá lithium-bis(trimethylsilyl)amid (61,2 ml, 61,2 mmol, 1 M roztok v THF) při teplotě -43°C . Reakční směs se mísí po dobu 15 minut a potom se přidá anhydrid kyseliny octové (5,8 ml, 63 mmol). Reakční směs se mísí po dobu 30 minut při teplotě -40°C . Přidá se kyselina octová (3,6 ml) a chladicí lázeň se odstraní. Reakční směs se extrahuje TBME (300 ml). Organická vrstva se separuje a promyje se vodou (3x150 ml), solankou (150 ml), suší se (síran sodný) a odpaří se za zisku surového produktu. Přečištění této sloučeniny se provede krystalizací ze směsi THF:heptanu (1:6). Ze 40 g suroviny se získá 21 g krystalizované titulní sloučeniny (60% výtěžek). LRMS(ESI) M^+ vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_{13}\text{Si}$: 746. Zjištěno 746.

Příklad 25:

Příprava 3'-terc.butyl-3'-N-terc.butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxelu



Roztok ()-cis-4-terc.butyl-1-(terc.butyloxykarbonyl)-3-triethylsilyloxy-azetidin-2-onu (2,71 g, 5 ekv.) a 4-deacetyl-

7-[bisisopropyl(methoxy)silyloxy-4-methoxykarbonyl-baccatinu (1,13 g, 1,52 mmol) v suchém THF (100 ml) pod atmosférou N₂ se ochladí na -50 °C a přidá se roztok lithium-bis-(trimethylsilyl)amidu (1,97 ml, 1,3 ekv., 1,0 M v THF). Po 5 min. se tento roztok přenesse do lázně o teplotě -35 až -30 °C na dobu 20 hodin a potom do lázně o teplotě -25 °C na dobu 24 hodin. Reakce se potom utlumí nasyceným vodným roztokem NH₄Cl a extrahuje se směsí EtOAc a hexanu (1:1). Organické extrakty se promyjí solankou a suší se (Na₂SO₄). Rozpouštědla se odstraní a zbytek se zpracuje chromatografií (radiální chromatografie 6 mm silikagelové destičce; gradientová eluce 5 až 20% EtOAc v hexanu) za zisku 1,55 g 3'-terc.butyl-3'-N-terc.butyloxykarbonyl-7-[bisisopropyl(methoxy)silyloxy-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-2'-triethylsilyloxypaclitaxelu jako směsi 2',3'-diastereomerů. Tato směs se rozpustí v suchém THF (60 ml) a přidá se triethylamintrihydrofluorid (0,92 ml 4 ekv.). Po 22 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs neutralizuje nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ a potom se extrahuje EtOAc. Organické extrakty se promyjí solankou, suší se (Na₂SO₄) a rozpouštědla se odstraní. Zbytek se zpracuje chromatografií (radiální chromatografie; 2 mm silikagelová destička; gradientová eluce od 10 do 50% EtOAc v hexanu) za zisku (podle pořadí eluce): 210 mg (18%) 2'S,3'R-3'-terc.butyl-3'-N-terc.butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3-N-debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxelu. ¹H NMR (CDCl₃) delta = 1,04 (s, 9H), 1,13 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,65 (s, 1H), 1,66 (s, 3H), 1,84-1,93 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 2,55 (m, 3H), 3,00 (d, 1H, J = 6,5 Hz), 3,74 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 3,79 (d, 1H, J=6,9 Hz), 3,92 (s, 3H), 4,16 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 4,33 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 4,42 (m, 1H), 4,54 (d, 1H, J = 6,5 Hz) 4,87 (d, 1H, J = 10,6 Hz), 5,01 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 5,68 (d, 1H, J=7,0 Hz), 5,76 (m, 1H), 6,32 (s, 1H), }7,44-8,05 (m, 5H); LRMS (ESI) 846 ((M+H)) a 668 mg (56%) titulní

sloučeniny. ^1H NMR (CDCl_3) delta 1,07 (s, 9H), 1,14 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 1,33 (s, 9H), 1,66 (s, 4H), 2,23 (s, 3H), 2,38-2,59 (m, 4H), 3,11 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz), 3,77 (d, 1H, $J = 11,1$ Hz), 3,82 (d, 1H, $J=7,0$ Hz), 3,96 (s, 3H), 4,20 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 4,33 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 4,39 (m, 1H), 4,53 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz), 4,88 (d, 1H, $J=10,6$ Hz), 4,98 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 5,69 (d, 1H, $J=7,1$ Hz), 6,03 (m, 1H), 6,28 (s, 1H), 7,40-8,11 (m, 5H); LRMS (ESI) 846 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

Předkládaný vynález není omezen na výše popsaná provedení, protože existují různé jeho variace a modifikace, které spadají do rozsahu připojených patentových nároků.

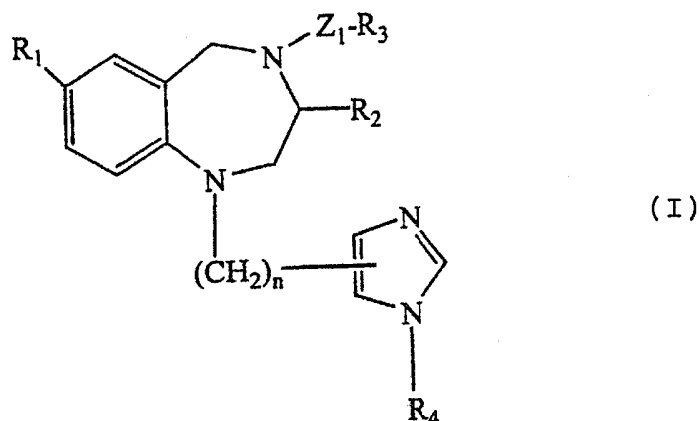


JUDr. Petr Kalenský
advokát

SPOLUPRÁVNÍ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠEPRÁVNÍ ZASTUPENÍ JUDR. PETR KALENSKÝ
A PARTNERŮ
120 00 Praha 2, Malá Strana 2
Česká republika

Patentové nároky

1. Použití sloučeniny obecného vzorce I



nebo její farmaceuticky přijatelné soli, kde

R_1 je Cl, Br, CN, popřípadě substituovaný fenyl, nebo popřípadě substituovaný 2-,3- nebo 4-pyridyl;

R_2 je popřípadě substituovaný nižší alkyl nebo popřípadě substituovaný aralkyl;

R_3 a R_5 jsou každý nezávisle popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě substituovaný aryl nebo popřípadě substituovaná heterocykloskupina;

R_4 je vodík nebo nižší alkyl;

Z_1 je CO, SO₂, CO₂ nebo SO₂N(R₅)-; a

n je 1 nebo 2;

pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní

cytotoxická činidla a cytostatická činidla, pro synergní léčení rakoviny.

2. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytotoxické činidlo je zaváděno před sloučeninou obecného vzorce I, pro synergní léčení rakoviny.

3. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž mezi cytotoxická činidla patří radioterapie, pro synergní léčení rakoviny.

4. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytostatické činidlo je zaváděno před sloučeninou obecného vzorce I, pro synergní léčení rakoviny.

5. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva pro léčení rakovinných solidních nádorů, používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, pro synergní léčení rakoviny.

6. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní

cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytotoxické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující činidla stabilizující mikrotubuly, činidla narušující mikrotubuly, alkylační činidla, anti-metabolity, epidofylotoxin, antineoplastické enzymy, inhibitory topoisomerasy, prokarbazin, mitoxantron a platinový koordinační komplex, pro synergní léčení rakoviny.

7. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytotoxické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující anthracykliny, alkaloidy čeledi Vinca, mitomycin, bleomycin, cytotoxické nukleosidy, taxan, epothilon, diskodermolid, pteridinová léčiva, diynen, inhibitor aromatasy a podofylotoxin, pro synergní léčení rakoviny.

8. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytotoxické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující paclitaxel, docetaxel, 7-O-methylthiomethyl-paclitaxel, 4-desacetyl-4-methylkarbonat-paclitaxel, 3'-terc-butyl-3'-N-terc-butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxel, C-4 methylkarbonat-paclitaxel, epothilon A, epothilon B, epothilon C, epothilon D, desoxyepothilon A, desoxyepothilon B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion, [1S[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-

-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-methylethenyl]-7,11-dihydroxy-
-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo[14.1.0]-
heptadekan-5,9-dion, doxorubicin, carminomycin, daunorubicin,
aminopterín, methotrexat, methopterin, dichlor-methotrexat,
mitomycin C, porfiromycin, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurin,
gemcitabin, cytosinarabínosid, podofylotoxin, etoposid,
etoposidfosfat, teniposid, melfalan, vinblastin, vincristin,
leurosídin, vindesin, leurosin, estramustin, cisplatinu,
karboplatinu, cyklofosfamid, bleomycin, ifosamid, melfalan,
hexamethylmelamin, thiotepu, cytarabin, idatrexat,
trimetrexat, dacarbazin, L-asparaginasu, kamptothecin,
CPT-11, topotekan, ara-C, bicalutamid, flutamid, leuprolid,
pyridobenzoinol, interferon a interleukin, pro synergní
léčení rakoviny.

9. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro
výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním
čínidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní
cytotoxická čínidla a cytostatická čínidla, přičemž
cytotoxické čínidlo je vybráno ze skupiny zahrnující taxan
a epothilon, pro synergní léčení rakoviny.

10. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro
výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním
čínidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní
cytotoxická čínidla a cytostatická čínidla, přičemž
cytotoxické čínidlo je vybraného ze skupiny zahrnující
paclitaxel, docetaxel, 7-O-methylthiomethyl-paclitaxel,
4-desacetyl-4-methylkarbonat-paclitaxel, 3'-terc-butyl-3'-N-
terc-butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-N-debenzoyl-
-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxel, C-4 methylkarbonat-
-paclitaxel, epothilon A, epothilon B, epothilon C, epothilon
D, desoxyepothilon A, desoxyepothilon B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,

10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-penta-methyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-methylethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion, pro synergní léčení rakoviny.

11. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž ve sloučenině obecného vzorce I

R₁ je Br nebo CN;

R₂ je popřípadě substituovaný benzyl;

R₃ je popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě substituovaný fenyl, popřípadě substituovaný 2-thienyl nebo popřípadě substituovaný 1-piperidyl;

R₄ je vodík nebo methyl;

Z₁ je CO, SO₂, nebo SO₂N(R₅)-;

R₅ je popřípadě substituovaný nižší alkyl nebo popřípadě substituovaný fenyl; a

n is 1,

pro synergní léčení rakoviny.

12. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž ve sloučenině obecného vzorce I

R_1 je CN;

R_2 je popřípadě substituovaný benzyl;

R_3 je popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě substituovaný fenyl, popřípadě substituovaný 2-thienyl nebo popřípadě substituovaný 1-piperidyl;

R_4 je vodík, nebo methyl;

Z je CO nebo SO_2 ; a

n je 1,

pro synergní léčení rakoviny.

13. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž ve sloučenině obecného vzorce I

R_1 je CN;

R_2 je benzyl;

R_3 je n-propyl, n-butyl, 3-methoxypropyl, 2-thienyl,

5-brom-2-thienyl, fenyl, 4-methoxyfenyl nebo 1-piperidyl;

R₄ je vodík;

Z je SO₂; a

n je 1,

pro synergní léčení rakoviny.

14. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž sloučenina obecného vzorce I je vybrána ze skupiny zahrnující:

(R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbo-nitril;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-(1-oxobutyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-4-[(5-brom-2-thienyl)sulfonyl]-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-[(4-methoxyfenyl)sulfonyl]-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-

-(fenylmethyl)-4-(fenylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-
-(fenylmethyl)-4-(propylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-4-(butylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-
imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-
-(fenylmethyl)-4-(1-piperidylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-4-(3-methoxypropylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-
-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodi-
azepin; a

jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení
rakoviny.

15. Použití sloučeniny podle nároku 14 ve formě farmaceuticky
přijatelné soli pro výrobu léčiva používaného v kombinaci
s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující
anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická
činidla, přičemž farmaceuticky přijatelná sůl je vybrána ze
skupiny zahrnující hydrochloridovou sůl, sůl kyseliny
methansulfonové a sůl kyseliny trifluoroctové, pro synergní
léčení rakoviny.

16. Použití sloučeniny podle nároku 10 obecného vzorce I pro
výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním
činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní
cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž
sloučeninou obecného vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-
-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienyl-

sulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, pro synergní léčení rakoviny.

17. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytotoxickým činidlem je paclitaxel a sloučeninou obecného vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, pro synergní léčení rakoviny.

18. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytotoxickým činidlem je [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo-[14.1.0]heptadekan-5,9-dion a sloučeninou obecného vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, pro synergní léčení rakoviny.

19. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu humánního léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, pro synergní léčení rakoviny.

20. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro

výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytostatické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující chirurgickou kastraci, chemickou kastraci, tamoxifen, 4-(3-chlor-4-fluorfenylamino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)-propoxy)chinazolin, 4-(3-ethinylnylfenylamino)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)chinazolin, hormony, steroidy, syntetické analogy steroidů, 17a-ethinylestadiol, diethylstilbestrol, testosteron, prednison, fluoxymesteron, dromostanolon-propionát, testolakton, megestrolacetát, methylprednisolon, methyltestosteron, prednisolon, triamcinolon, chlorotrianisen, hydroxyprogesteron, aminoglutethimid, estramustin, medroxyprogesteronacetát, leuprolid, flutamid, toremifen, zoladex, antiangiogenní činidla, inhibitory metaloproteinas matrice, VEGF inhibitory, ZD6474, SU6668, anti-Her2 protilátky, EGFR inhibitory, EKB569, Imclone protilátku C225, src inhibitory, bicalutamid, inhibitory epidermálního růstového faktoru, Her-2 inhibitory, inhibitory MEK-1 kinasy, inhibitory MAPK kinasy, PI3 inhibitory, PDGF inhibitory, combretastatiny, inhibitory MET kinasy, inhibitory MAP kinasy, inhibitory non-receptorových a receptorových tyrosin kinas, inhibitory integrinové signalizace a inhibitory receptorů pro insulin-like růstový faktor, pro synergní léčení rakoviny.

21. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž cytostatické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující bicalutamid, tamoxifen, 4-(3-chlor-4-fluorfenylamino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)propoxy)chinazolin, Her-1

inhibitory a trastuzumab, pro synergní léčení rakoviny.

22. Farmaceutický prostředek pro synergní léčbu nádorů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje buď cytostatické činidlo nebo cytotoxické činidlo nebo obě tato činidla a také sloučeninu vzorce I podle nároku 1, a farmaceuticky přijatelný nosič vzorce I.

23. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro synergní léčbu rakovinných solidních nádorů.

24. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxickým činidlem je alespoň jedno anti-neoplastické činidlo vybrané ze skupiny zahrnující činidla stabilizující mikrotubuly, činidla narušující mikrotubuly, alkylační činidla, anti-metabolity, epidofylotoxin, antineoplastické enzymy, inhibitory topoisomerasy, prokarbazin, mitoxantron a platinový koordinační komplex.

25. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxickým činidlem je alespoň jedno anti-neoplastické činidlo vybrané ze skupiny zahrnující anthracyklinová léčiva, alkaloidy čeledi Vinca, mitomycin, bleomycin, cytotoxické nukleosidy, taxan, epothilon, discodermolid, pteridinová léčiva, diynen, inhibitor aromatasy a podofylotoxin.

26. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxickým činidlem je alespoň jedno anti-neoplastické činidlo vybrané ze skupiny zahrnující paclitaxel, docetaxel, 7-O-methylthiomethyl-paclitaxel, 4-desacetyl-4-methylkarbonat-paclitaxel, 3'-terc-butyl-3'-N-

-terc-butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-N-debenzoyl-
-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxel, C-4 methylkarbonat-
-paclitaxel, epothilon A, epothilon B, epothilon C, epothilon
D, desoxyepothilon A, desoxyepothilon B, [1S-[1R*,
3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-
pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-
-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion, [1S-[1R*,
3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminomethyl)-4-
-thiazolyl]-1-methylethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-
-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion,
doxorubicin, carminomycin, daunorubicin, aminopterin,
methotrexat, methopterin, dichlor-methotrexat, mitomycin C,
porfiromycin, 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin, gemcitabin,
cytosinarabinosid, podofylotoxin, etoposid, etoposidfosfat,
teniposid, melfalan, vinblastin, vinkristin, leurosadin,
vindesin, leurosin, estramustin, cisplatinu, karboplatinu,
cyklofosfamid, bleomycin, ifosamid, melfalan,
hexamethylmelamin, thiotepu, cytarabin, idatrexat,
trimetrexat, dacarbazin, L-asparaginasu, kamptothecin,
CPT-11, topotecan, ara-C, bicalutamid, flutamid, leuprolid,
pyridobenzoindol, interferon a interleukin.

27. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že cytotoxické činidlo je vybráno ze skupiny
zahrnující taxan a epothilon.

28. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že cytotoxickým činidlem je alespoň jedno anti-
neoplastické činidlo vybrané ze skupiny zahrnující
paclitaxel, docetaxel, 7-O-methylthiomethyl-paclitaxel,
4-desacetyl-4-methytkarbonat-paclitaxel, 3'-terc-butyl-3'-
-N-terc-butyloxykarbonyl-4-deacetyl-3'-defenyl-3'-
-N-debenzoyl-4-O-methoxykarbonyl-paclitaxel, C-4

methylkarbonat-paclitaxel, epothilon A, epothilon B, epothilon C, epothilon D, desoxyepothilon A, desoxyepothilon B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)-ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion a [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminomethyl)-4-thiazolyl]-1-methylethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion.

29. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytostatické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující chirurgickou kastraci, chemickou kastraci, tamoxifen, 4-(3-chlor-4-fluorfenylamino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)-propoxy)chinazolin, 4-(3-ethinylnfenylamino)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)chinazolin, hormony, steroidy, syntetické analogy steroidů, 17a-ethinylestradiol, diethylstilbestrol, testosteron, prednison, fluoxymesteron, dromostanolon-propionát, testolakton, megestrolacetát, methylprednisolon, methyl-testosteron, prednisolon, triamcinolon, chlorotrianisen, hydroxyprogesteron, aminogluthetimid, estramustin, medroxyprogesteronacetát, leuprolid, flutamid, toremifen, zoladex, antiangiogenní činidla, inhibitory metaloproteinas matrice, VEGF inhibitory, ZD6474, SU6668, anti-Her2 protilátky, EGFR inhibitory, EKB569, Imclone protilátku C225, src inhibitory, bicalutamid, inhibitory epidermálního růstového faktoru, Her-2 inhibitory, inhibitory MEK-1 kinasy, inhibitory MAPK kinase, PI3 inhibitory, PDGF inhibitory, combretastatiny, inhibitory MET kinasy, inhibitory MAP kinasy, inhibitory non-receptorových a receptorových tyrosin kinas, inhibitory integrinové signalizace, inhibitory receptorů pro insulin-like růstový faktor.

30. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že cytostatické činidlo je vybráno ze skupiny
zahrnující bicalutamid, tamoxifen, 4-(3-chlor-4-fluorfenyl-
amino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)propoxy)chinazolin,
Her-1 inhibitory a trastuzumab.

31. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že

R_1 je Br nebo CN;

R_2 je popřípadě substituovaný benzyl;

R_3 je popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě
substituovaný fenyl, popřípadě substituovaný 2-thienyl nebo
popřípadě substituovaný 1-piperidyl;

R_4 je vodík nebo methyl;

Z_1 je CO, SO₂ nebo SO₂N(R_5)-;

R_5 je popřípadě substituovaný nižší alkyl nebo popřípadě
substituovaný fenyl; a

n is 1.

32. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že

R_1 je CN;

R_2 je popřípadě substituovaný benzyl;

01.07.03

R_3 je popřípadě substituovaný nižší alkyl, popřípadě substituovaný fenyl, popřípadě substituovaný 2-thienyl nebo popřípadě substituovaný 1-piperidyl;

R_4 je vodík, nebo methyl;

Z je CO nebo SO_2 ; a

n je 1.

33. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

R_1 je CN;

R_2 je benzyl;

R_3 je n-propyl, n-butyl, 3-methoxypropyl, 2-thienyl, 5-brom-2-thienyl, fenyl, 4-methoxyfenyl nebo 1-piperidyl;

R_4 je vodík;

Z je SO_2 ; a

n je 1.

34. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina obecného vzorce I je vybrána ze skupiny zahrnující:

(R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbo-
nitril;

01.07.03

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-(1-oxobutyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-4-[(5-brom-2-thienyl)sulfonyl]-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-[(4-methoxyfenyl)sulfonyl]-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(fenylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(propylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-4-(butylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(1-piperidylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin;

(R)-4-(3-methoxypropylsulfonyl)-7-kyan-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-1H-1,4-benzodiazepin; a

jejich farmaceuticky přijatelné soli.

35. Prostředek podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že farmaceuticky přijatelná sůl je vybrána ze skupiny zahrnující hydrochloridovou sůl, sůl kyseliny methan-

sulfonové a sůl kyseliny trifluoroctové.

36. Prostředek podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučeninou obecného vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

37. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxickým činidlem je paclitaxel a sloučeninou obecného vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

38. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxickým činidlem je [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxa-bicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion a sloučeninou vzorce I je (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

39. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva používaného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, pro synergní léčení rakoviny, kde rakovinou je karcinom prostaty, prsu, nemalobuněčný karcinom plic, metastazující karcinom močového měchýře, kolorektální karcinom nebo karcinom slinivky břišní,

40. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e

t í m, že cytotoxickým činidlem je jedno nebo více cytotoxických činidel vybraných ze skupiny zahrnující paclitaxel, cis-platinu, karboplatinu, gemcitabin, CPT-11, leukovorin, tegafur, uracil, 5-fluorouracil, 4-(3-ethinyl-fenylamino)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)chinazolin a 4-(3-chlor-4-fluorfenylamino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)-propoxy)chinazolin.

41. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedním z uvedených cytotoxických činidel je paclitaxel, který je zaváděn před podáním (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

42. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedním z uvedených cytotoxických činidel je [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion, který je zaváděn před podáním (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

43. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro

výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytotoxických činidel je CPT-11, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

44. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytotoxických činidel je gemcitabin nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

45. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytostatických činidel je 4-(3-brom-fenylamino)-6,7-bis(methoxy)chinazolin, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

46. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním

činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytostatických činidel je trastuzumab, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

47. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytostatických činidel je 4-(3-chlor-4-fluorfenylamino)-7-methoxy-6-(3-(4-morfolinyl)propoxy)-chinazolin, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

48. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytostatických činidel je tamoxifen, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

49. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní

cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytostatických činidel je kastrace, která je aplikována před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

50. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž alespoň jedno z uvedených cytotoxických činidel je N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolylmethyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinkarboxamid nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, který je zaváděn před zavedením (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, pro synergní léčení rakoviny.

51. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž uvedeným alespoň jedním cytotoxickým činidlem je paclitaxel s režimem zavádění v přibližně tří-hodinové infusní dávce přibližně 135 mg/m² a potom s režimem zavádění jednohodinovou infusí (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli v dávce přibližně 50 mg/m², kde jak paclitaxel, tak (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl jsou podávány v přibližně

01.07.03

3-týdenních intervalech podle potřeby, pro synergní léčení rakoviny.

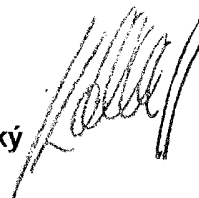
52. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž uvedeným alespoň jedním cytotoxickým činidlem je paclitaxel s režimem zavádění během přibližně jednohodinové infuze v dávce přibližně 80 mg/m^2 a potom se režimem zavádění jednohodinovou infusí (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli v dávce přibližně 80 mg/m^2 , kde jak paclitaxel, tak (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitril nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl mají režim zavádění v přibližně 1-týdenních intervalech, podle potřeby, pro synergní léčení rakoviny.

53. Použití sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu léčiva zaváděného v kombinaci s alespoň jedním činidlem vybraným ze skupiny zahrnující anti-proliferativní cytotoxická činidla a cytostatická činidla, přičemž jsou podávána cytotoxická činidla, kde uvedenými cytotoxickými činidly je paclitaxel se režimem zavádění během přibližně 3 hodin v dávce přibližně 135 mg/m^2 a potom s režimem zavádění přibližně 20-minutovou infusí karboplatiny v AUC rovném přibližně 6, kde paclitaxel a karboplatina mají režim zavádění v přibližně 3-týdenním intervalu, kde dále je režim zavádění přibližně týdně (R)-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(fenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-karbonitrilu nebo jeho farmaceuticky

01.07.03

přijatelná sůl v dávce přibližně 80 mg/m², pro synergní
léčení rakoviny.

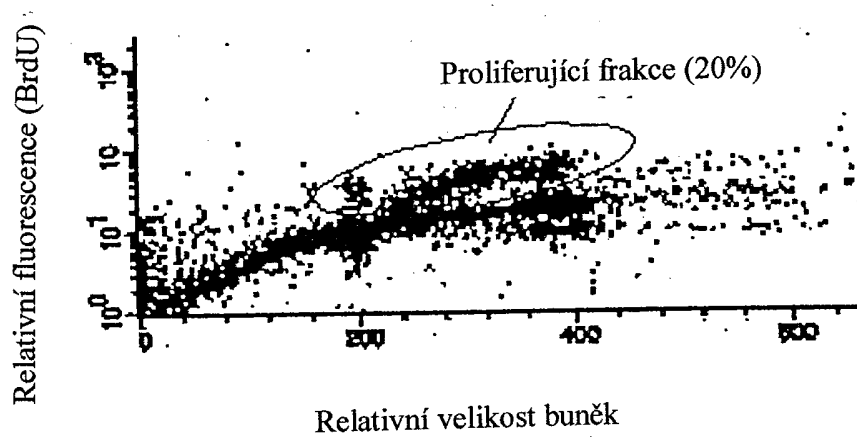
JUDr. Petr Kalenský
advokát



SPOLÉČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VSELECKA ZELENÝ SVORČIK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

25.02.03

TV 2002 - 3220

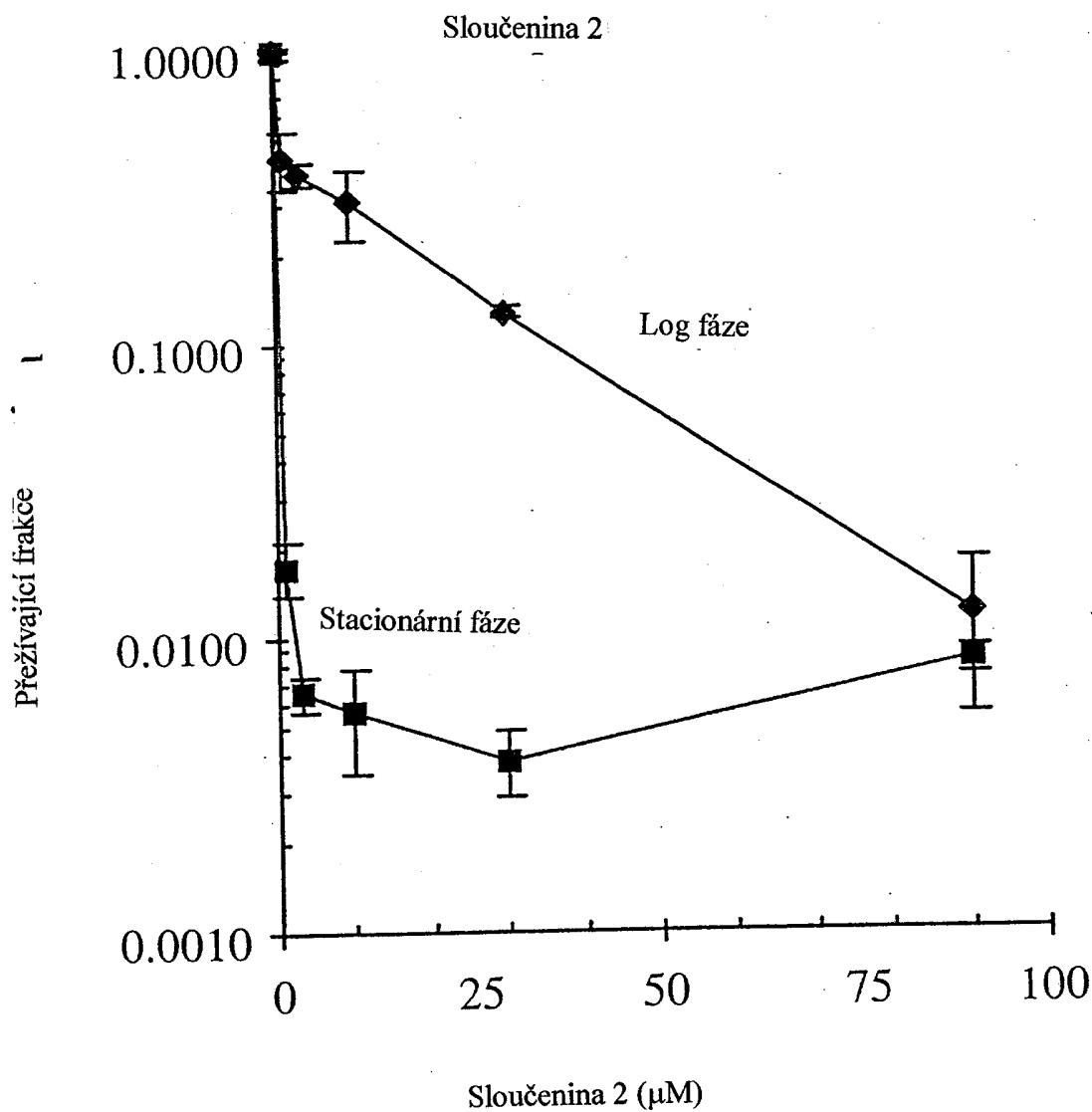


Obr. 1


JUDr. Miloš Kalašný
advokát

25.02.03

PV 2002 - 3220



Obr. 2

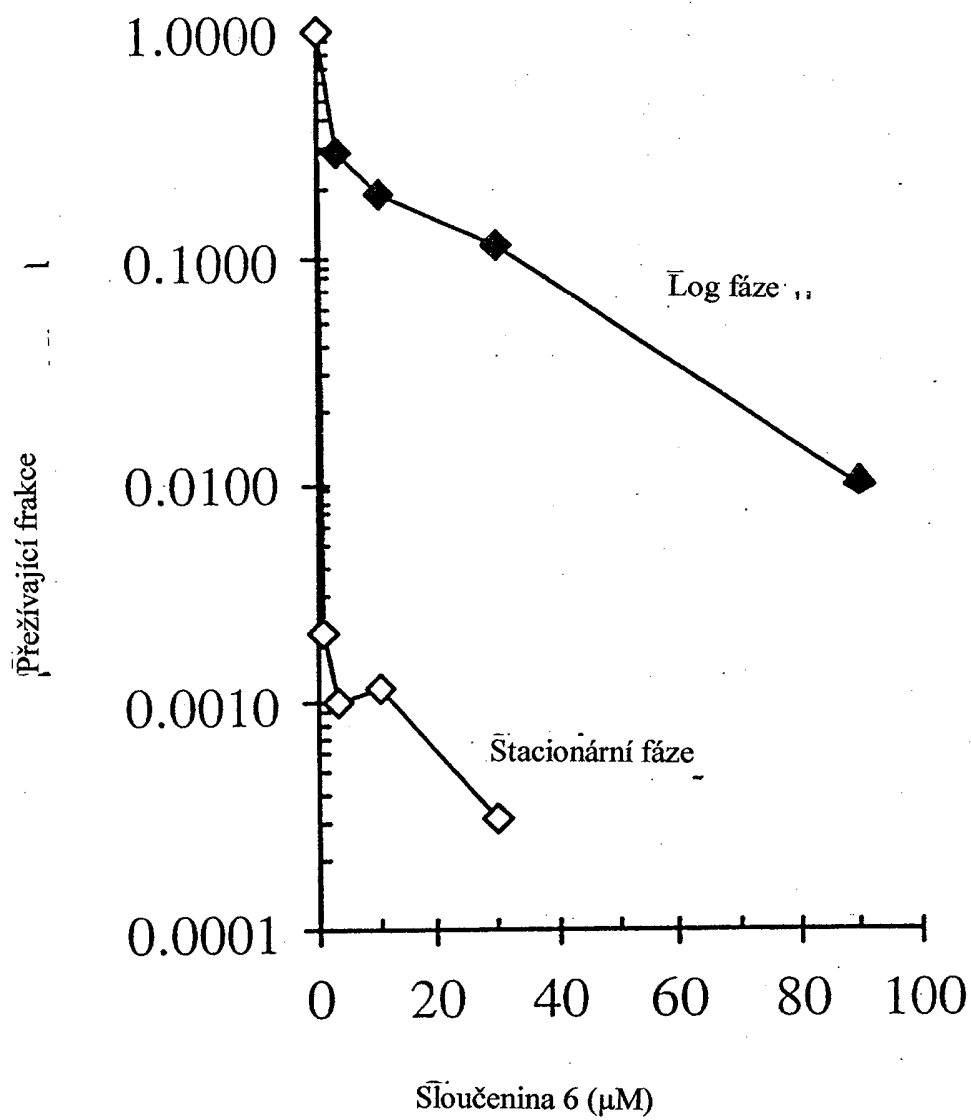
[Handwritten signature]

[Faint printed text]

25.02.03

PV 2002-3220

Sloučenina 6



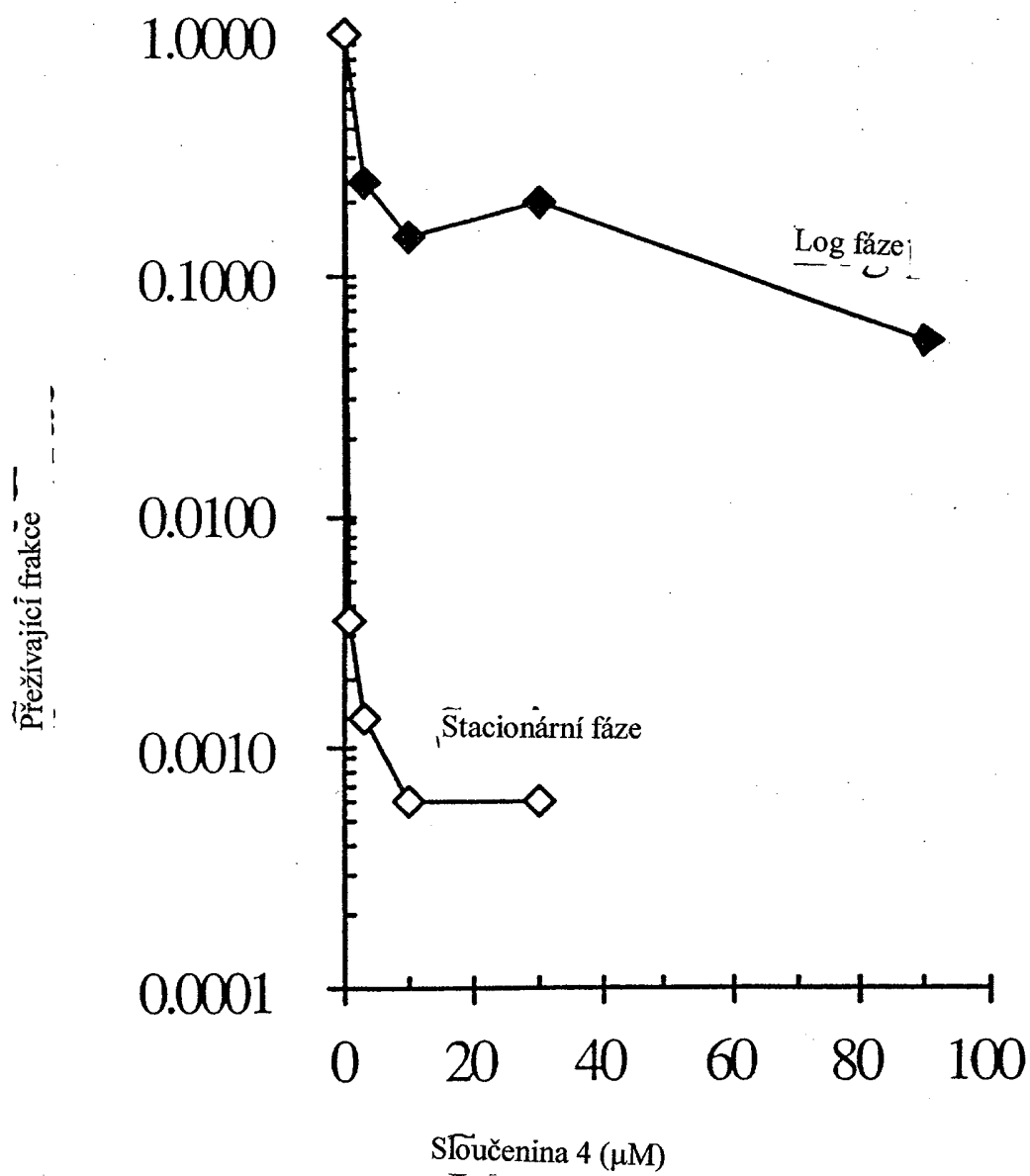
Obr. 3

Dr. Petr Kabaník
advokát

25.02.03

PV 2002-3220

Sloučenina 4



Obr. 4

[Handwritten signature]

Dr. Petr Kulonský
advokát

PV 2002-3220

The graph illustrates the effect of paclitaxel concentration on the survival fraction of cells in two different growth phases. The y-axis represents the survival fraction on a logarithmic scale, and the x-axis represents the concentration of paclitaxel in μM .

Stacionární fáze (Stationary phase): The survival fraction remains constant at 1.0000 across the entire concentration range from 0 to 160 μM .

Log fáze (Log phase): The survival fraction decreases sharply as the concentration of paclitaxel increases, reaching approximately 0.1000 at 25 μM .

Konc. paclitaxelu (μM)	Přezívající frakce (Stacionární fáze)	Přezívající frakce (Log fáze)
0	1.0000	1.0000
5	1.0000	0.4000
25	1.0000	0.1000
50	1.0000	-
100	1.0000	-
150	1.0000	-
160	1.0000	-

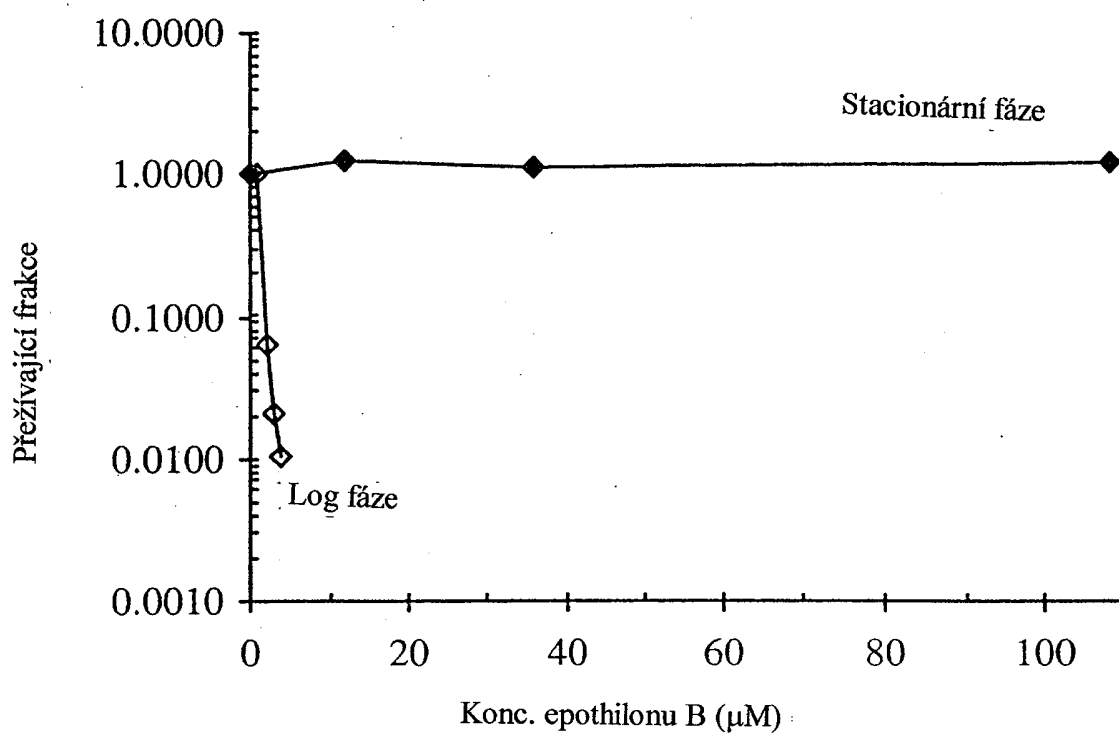
Obr. 5

6. 1990年12月15日，在《人民日报》发表署名文章《中国要警惕“新左派”的泛滥》，指出“新左派”泛滥的根源是“中国改革不彻底”。

25.02.03

PV 2002-3220

Epothilon B



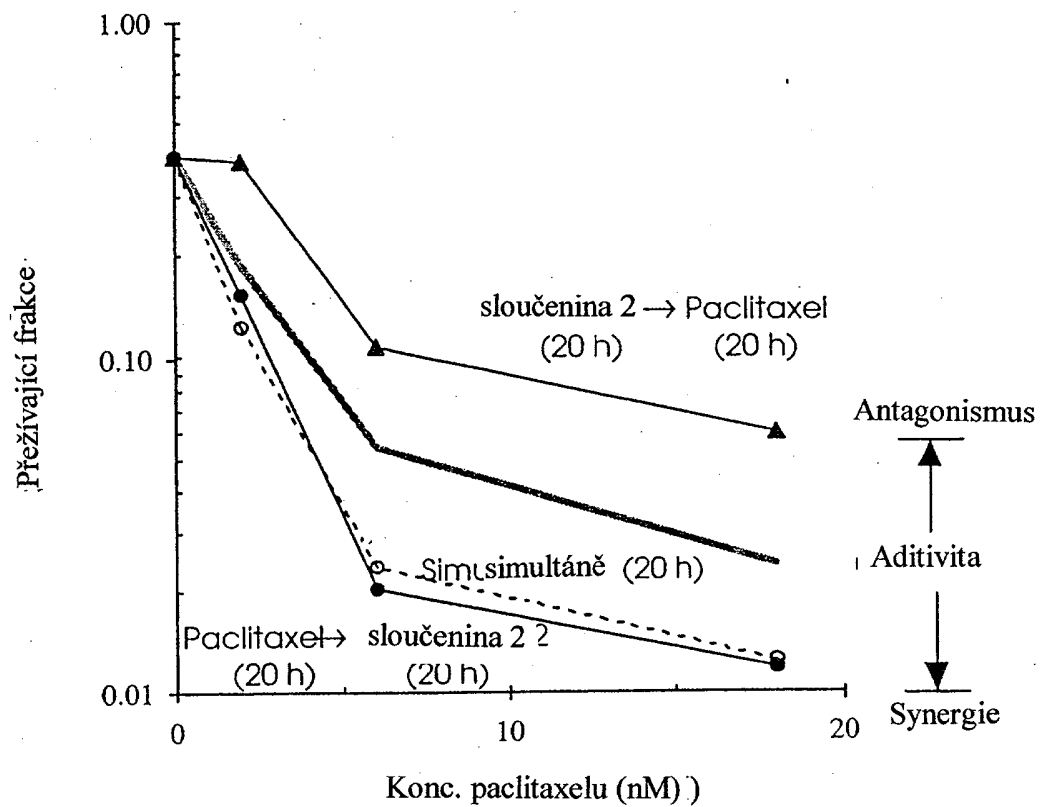
Obr. 6

JUDr. M. Kolářský

25.03.03

PV 2002-3220

Kombinovaná chemoterapie paclitaxelem + sloučeninou 2



Obr. 7

[Handwritten signature]
 MUDr. Petr Kalina
 2003

PV 2002-3220

Přezívající frakce

Konc. sloučeniny 1 (nM)

sekvenčně: χ :
sloučenina 1 $\rightarrow$ sloučenina 2

Antagonismus

Aditivita

Synergie

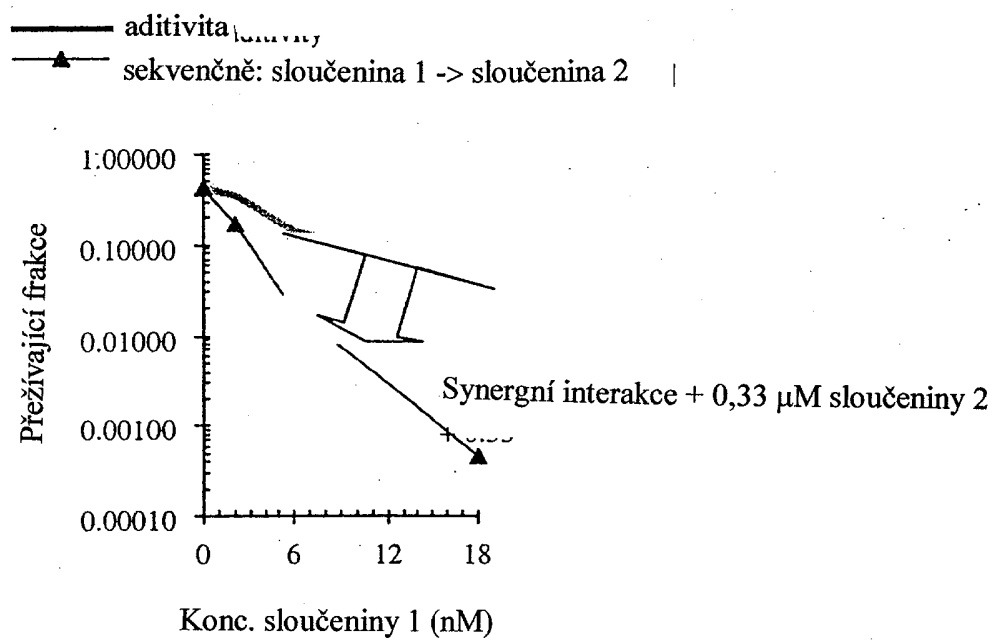
Obr.8

[Handwritten signature]

25.02.03

PV 2002-3220

Kombinovaná chemoterapie sloučeninou 1 + sloučeninou 2



Obr.9

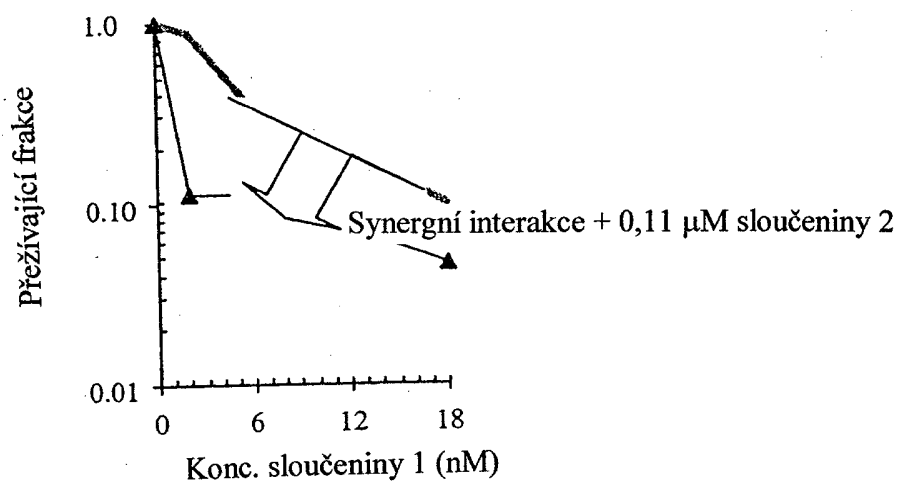
JUDr. Petr Kolář
advokát

25.02.03

PV 2002-3220

Kombinovaná chemoterapie sloučeninou 1 + sloučeninou 2

— aditivita
—▲ sekvenčně: sloučenina 1 → sloučenina 2



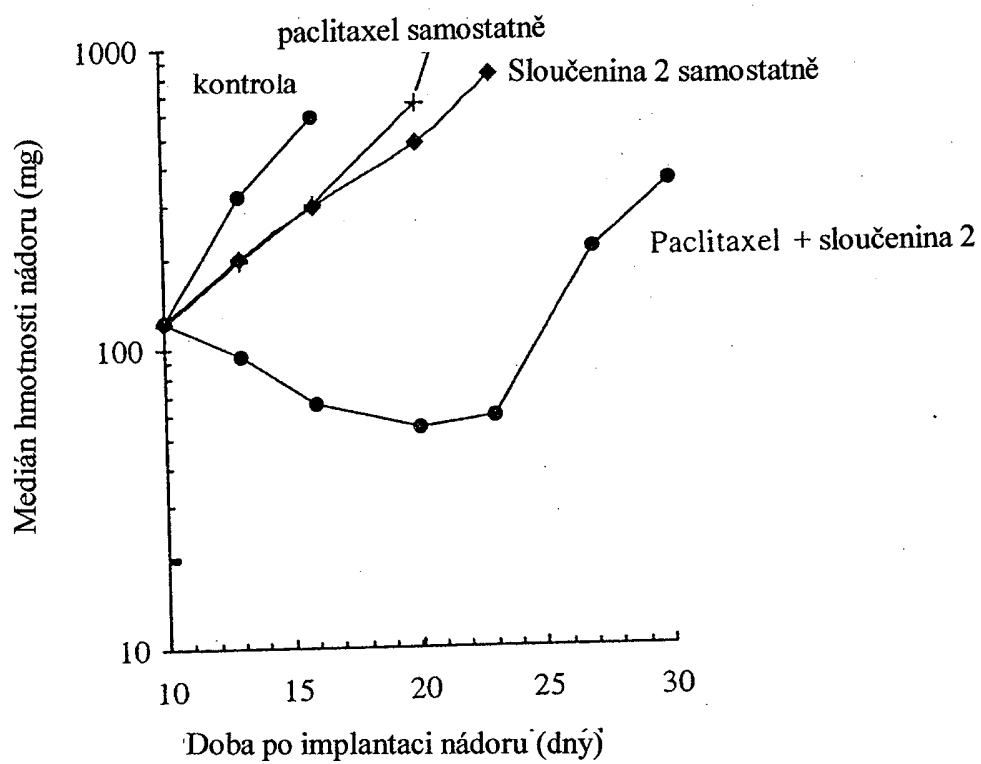
Obr. 10

[Signature]
J. Dr. Petr Kolář
Univerzita

25.02.03

PV 2002 - 3220

Kombinovaná chemoterapie paclitaxelem + sloučeninou 2



Obr. 11

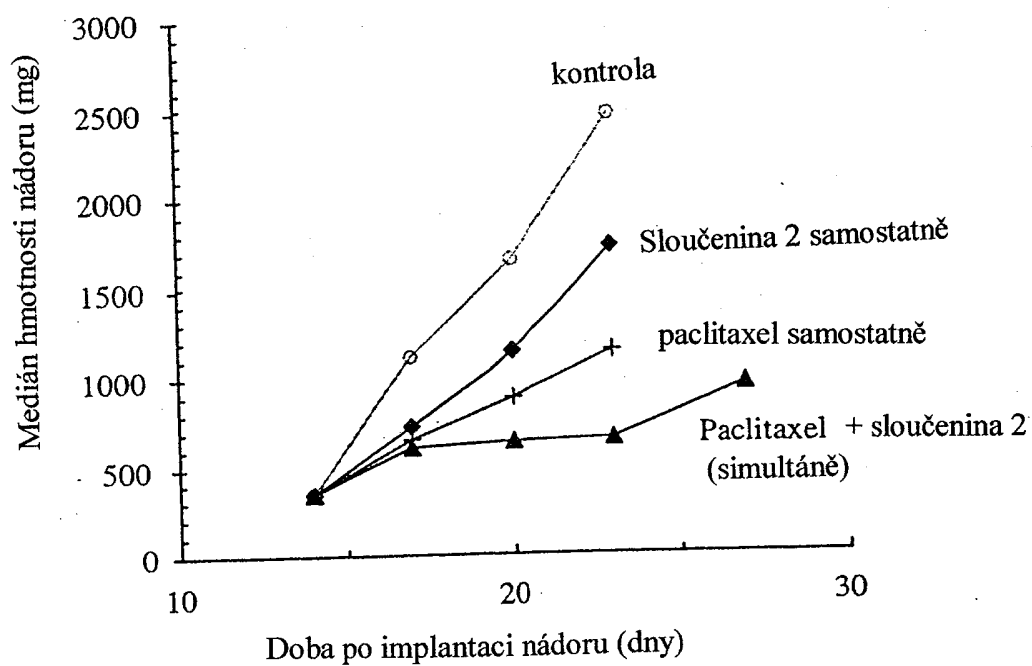
[Handwritten signature]

JUDr. Miroslav J. Janda
adviser

25.02.03

PV 2002-3220

Kombinovaná chemoterapie paclitaxelem + sloučeninou 2

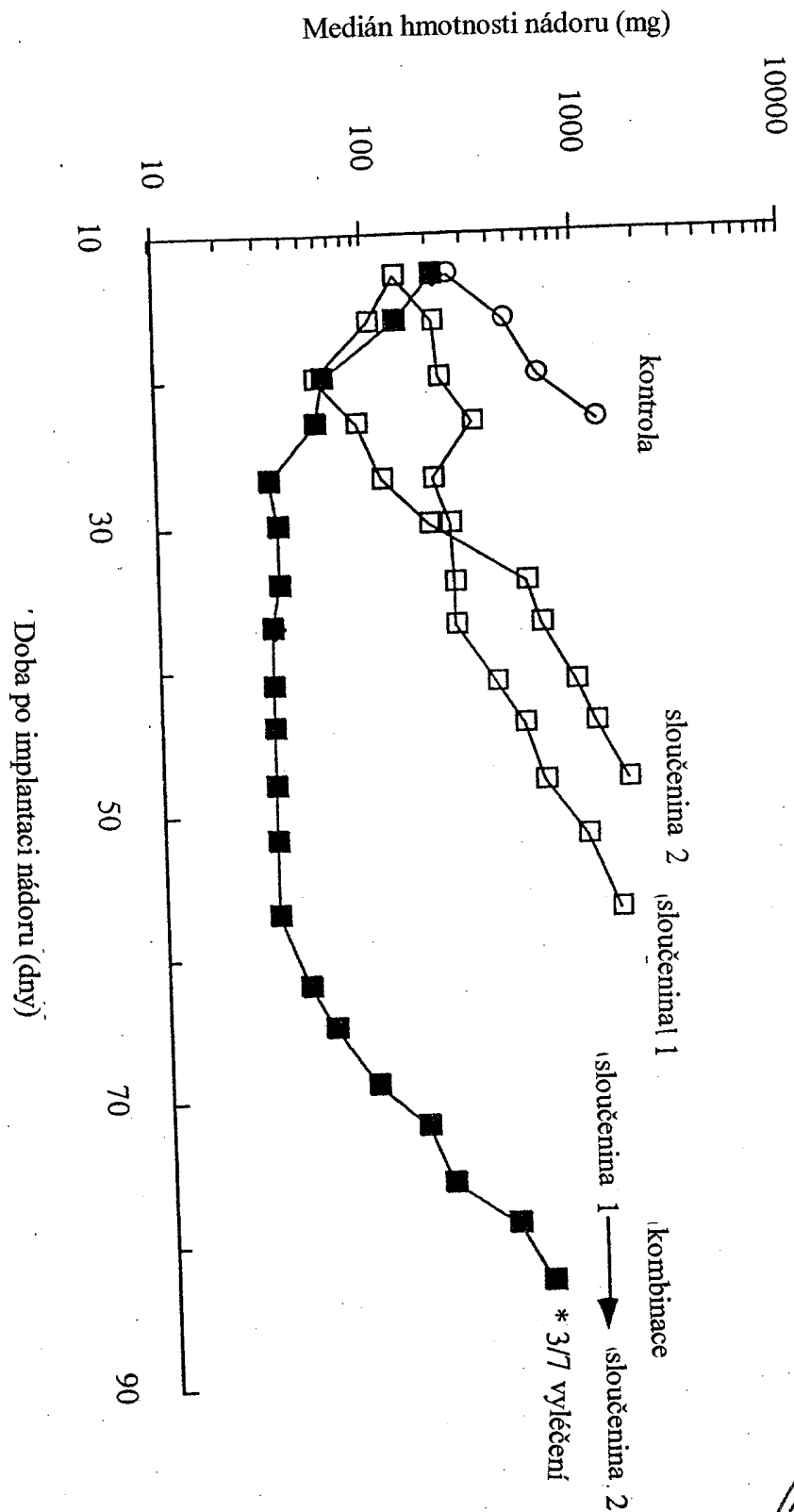


Obr. 12'

JUDr. Petr Křížek
advokát

25.02.03

PV 2002 - 3220

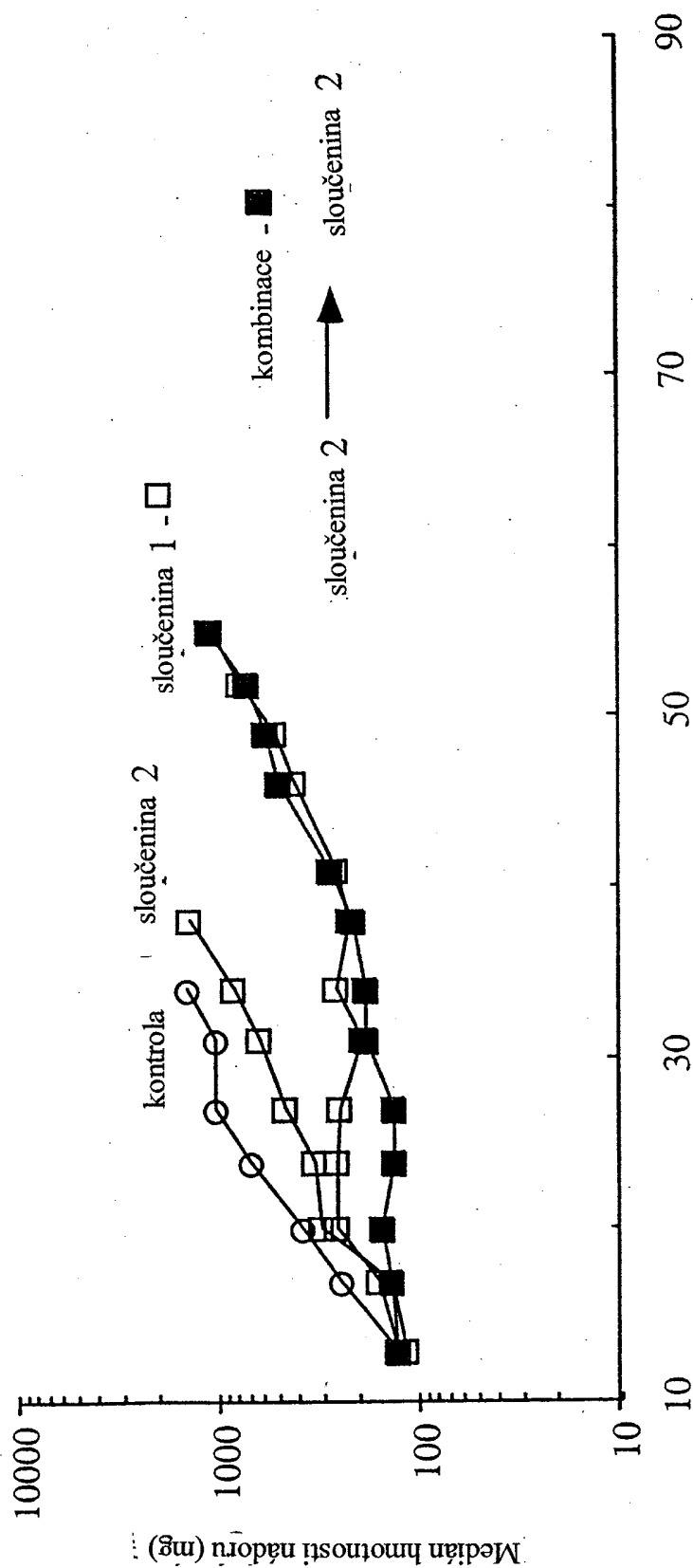


Obt. 13

Stav. 100.000000
advice

25.02.03

PV 2002 - 3220



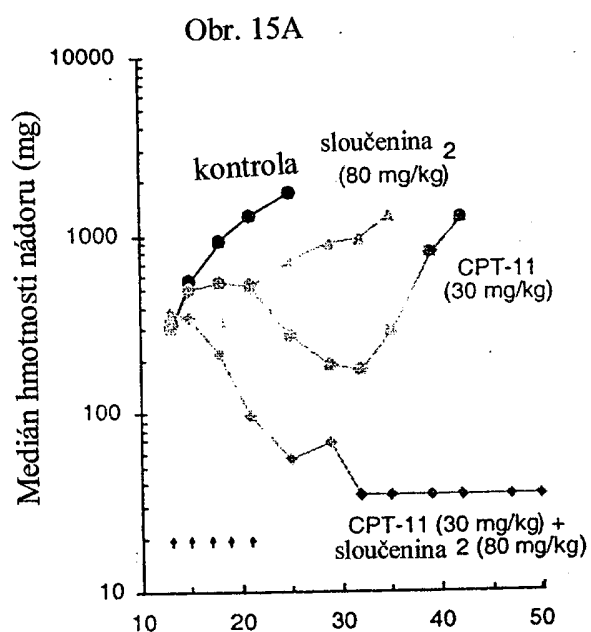
Doba po implantaci nádoru (dny)

Obr. 14

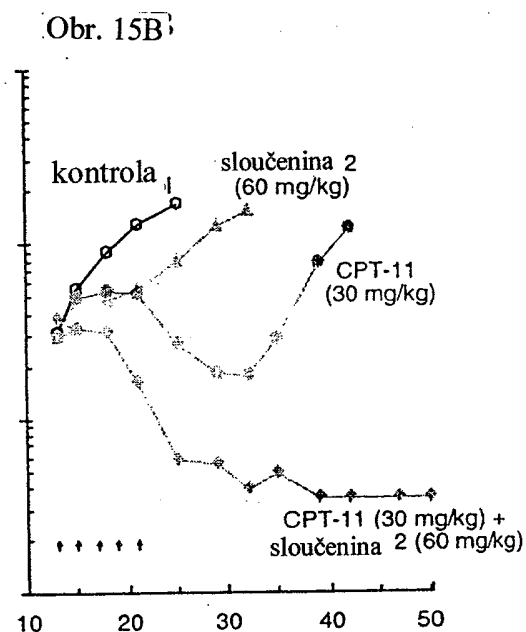
Šedivý
advokát

25.02.03

PI 2002-1220



Doba po implantaci nádoru (dny)



[Signature]

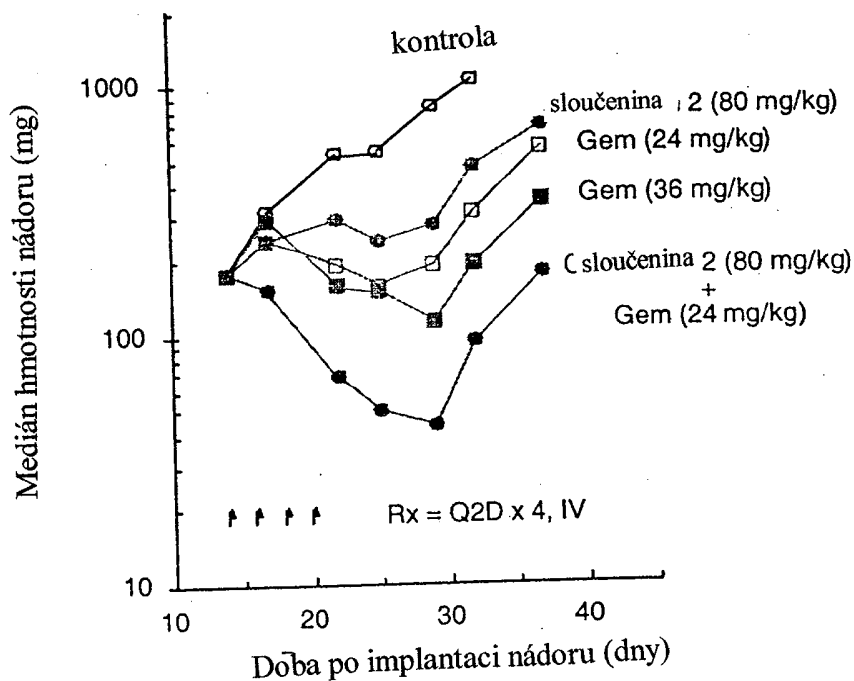
JUDr. Petr Kolář

lékař

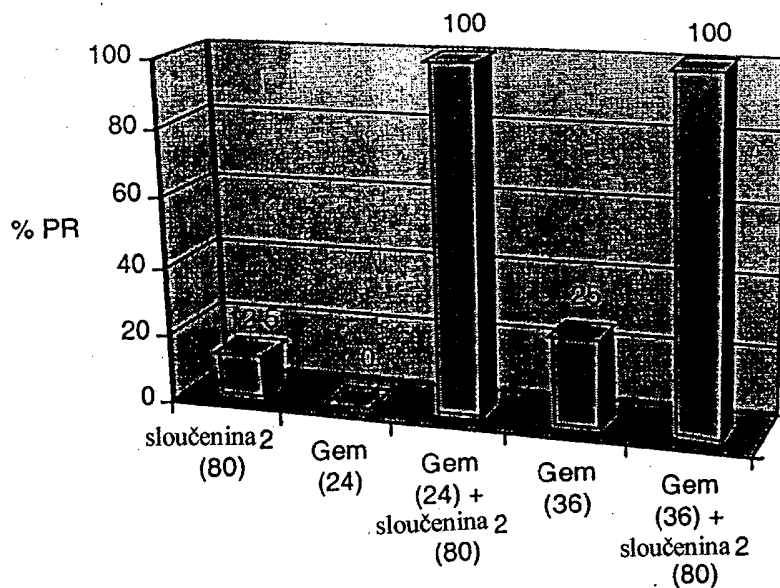
25.02.03

PV 2002-3220

Obr. 16A



Obr. 16B



[Signature]

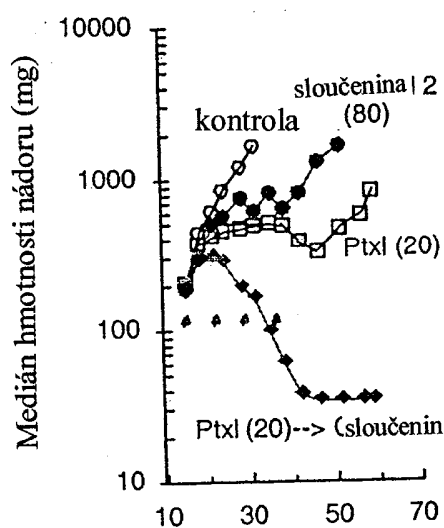
JUDr. Petr Nedelka

adviser

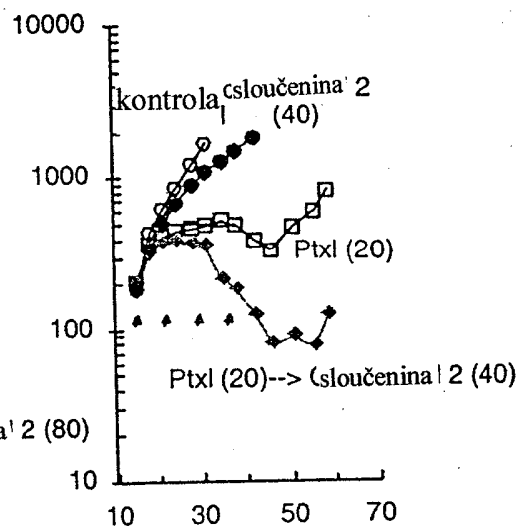
25.02.03

PV 2002-3220

Obr. 17A

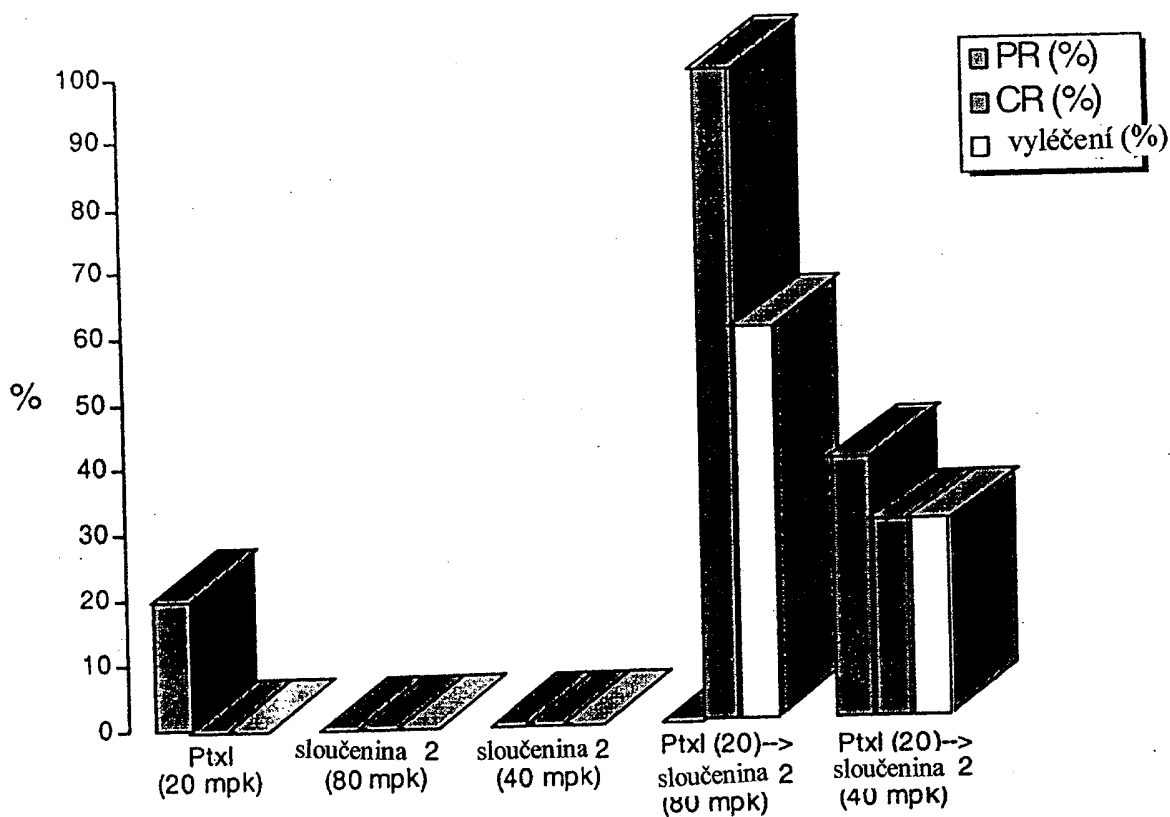


Obr. 17B



Doba po implantaci nádoru (dny)

Obr. 17C



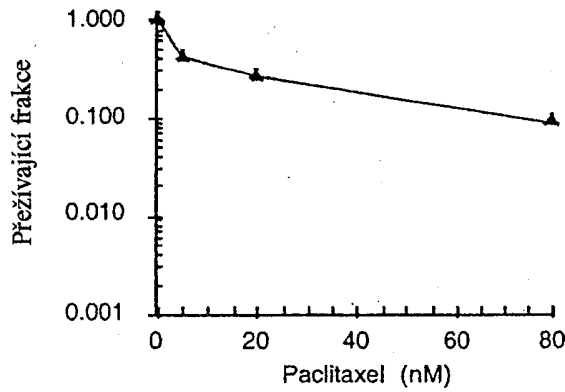
UD. P. Kolářský
advokát

[Handwritten signature]

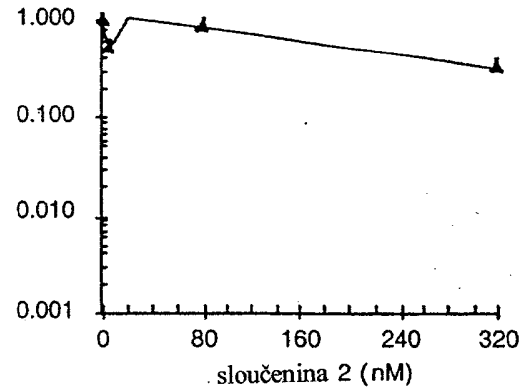
25.02.03

PV 2002-3220

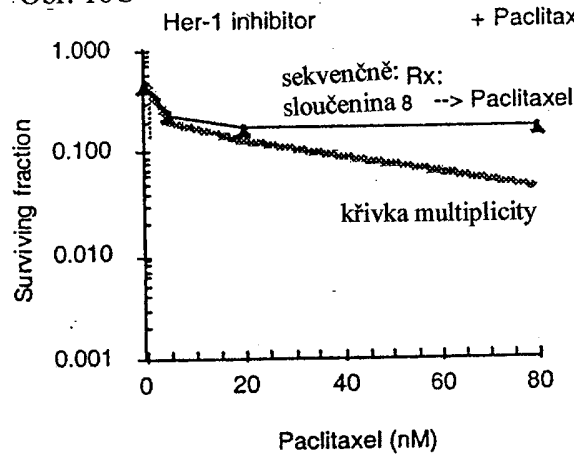
Obr. 18A Paclitaxel samostatně



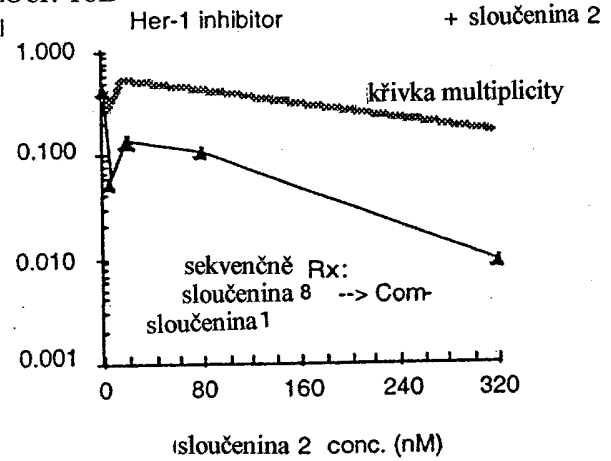
Obr. 18B Sloučenina 2 samostatně



Obr. 18C



Obr. 18D

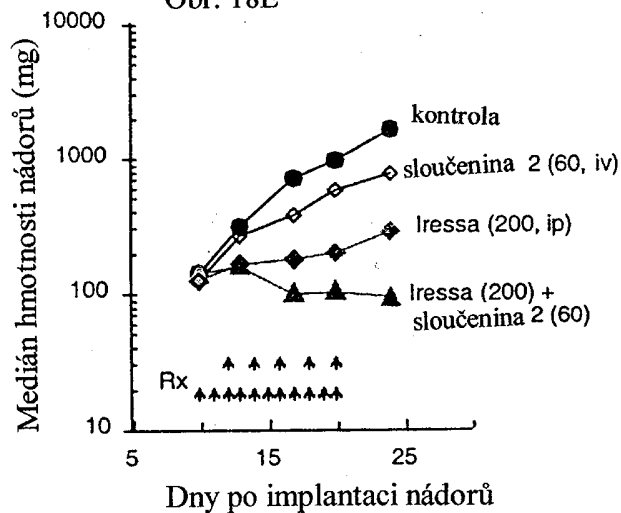


JUB. Dr. Kallina
autograf

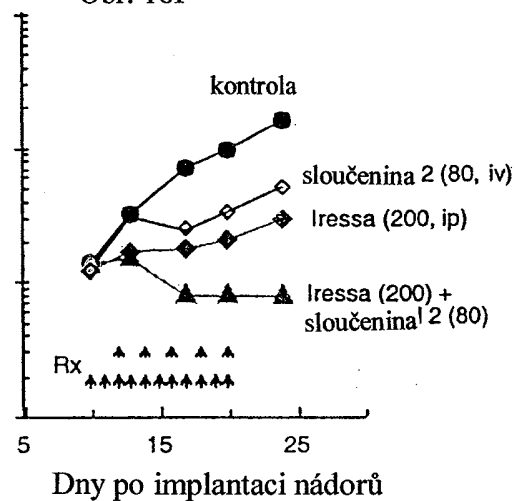
25.02.03

PV 2002-1220

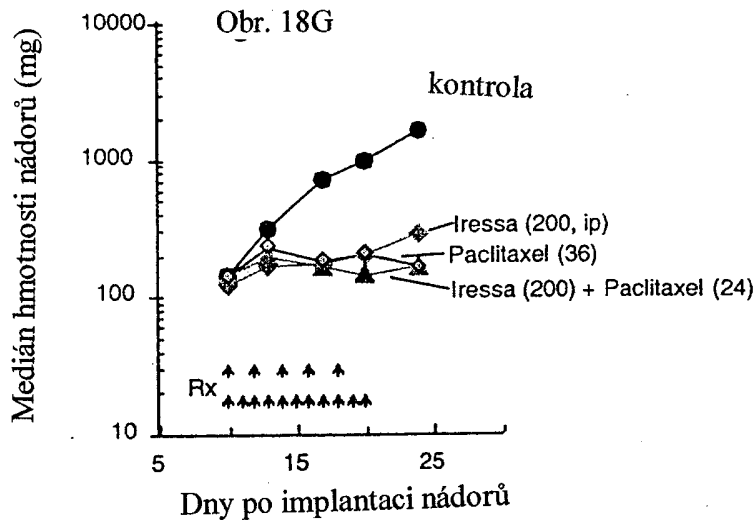
Obr. 18E



Obr. 18F



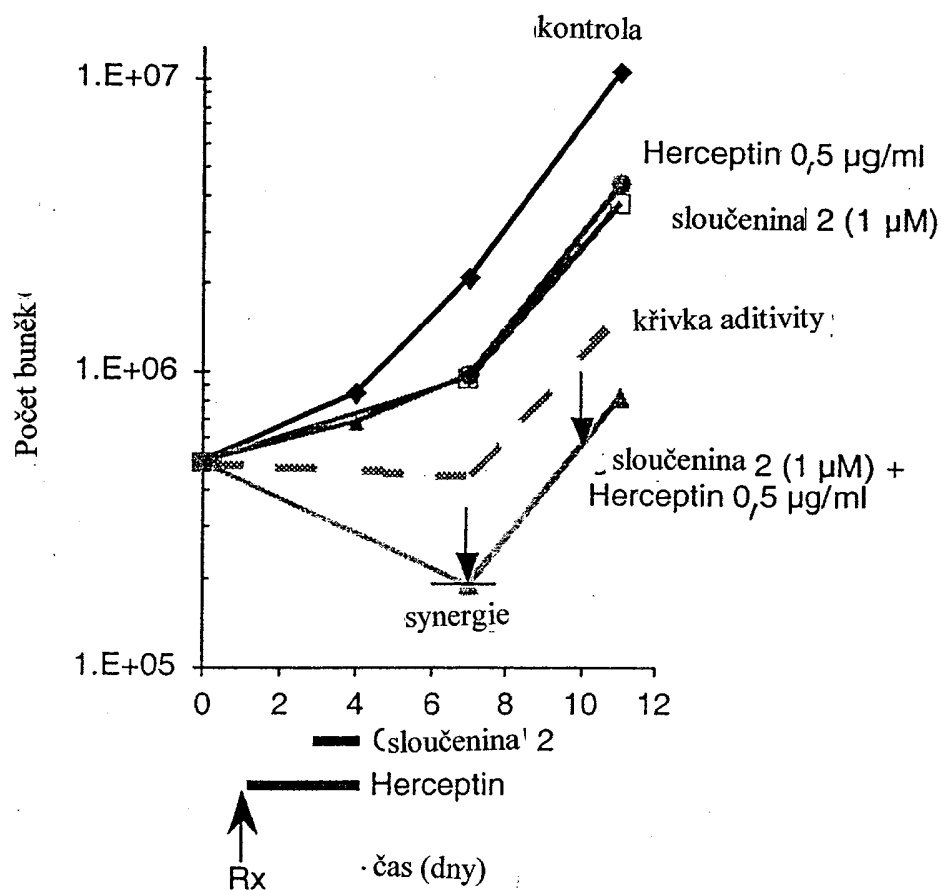
Obr. 18G



[Handwritten signature]
 JUDr. Petr Kalenšný
 advokát

25.02.03

PV 2002-3220



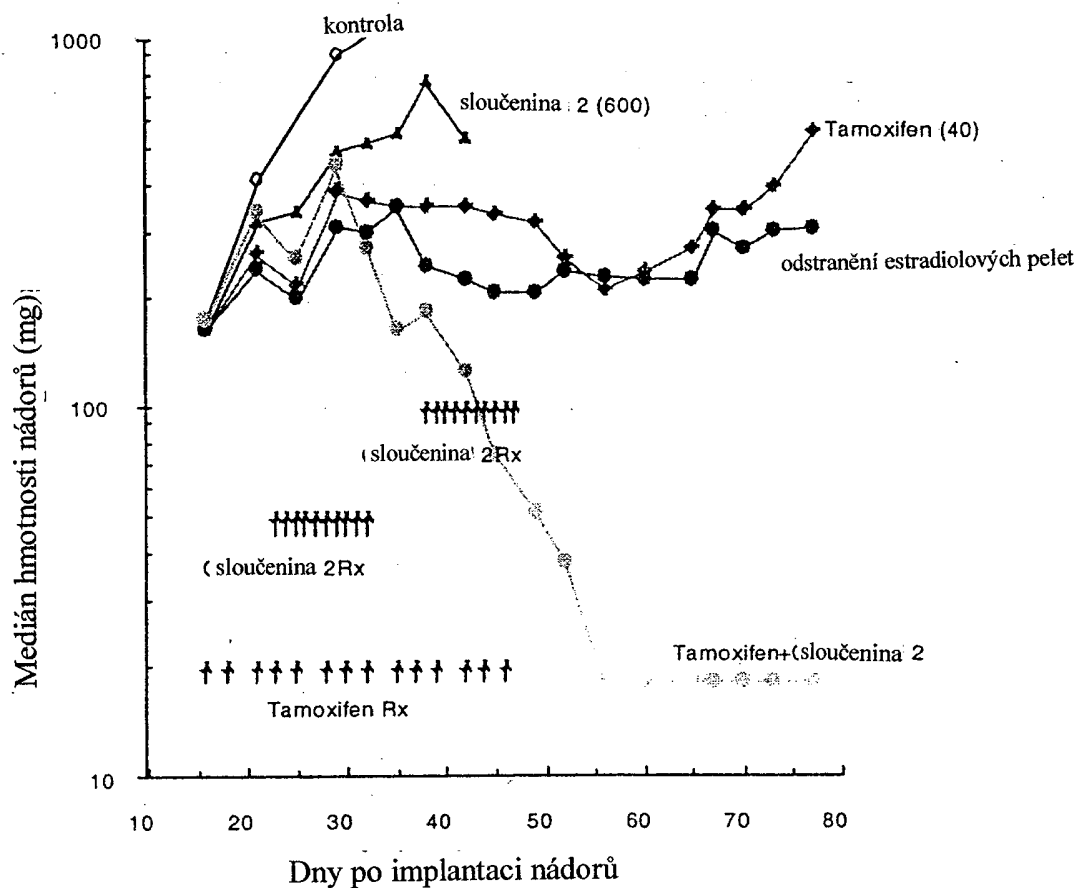
Obr. 19)

[Handwritten signature]

UDr. Petr Kalina
advokát

25.00.03

PV 2002-3220



Obr. 20)

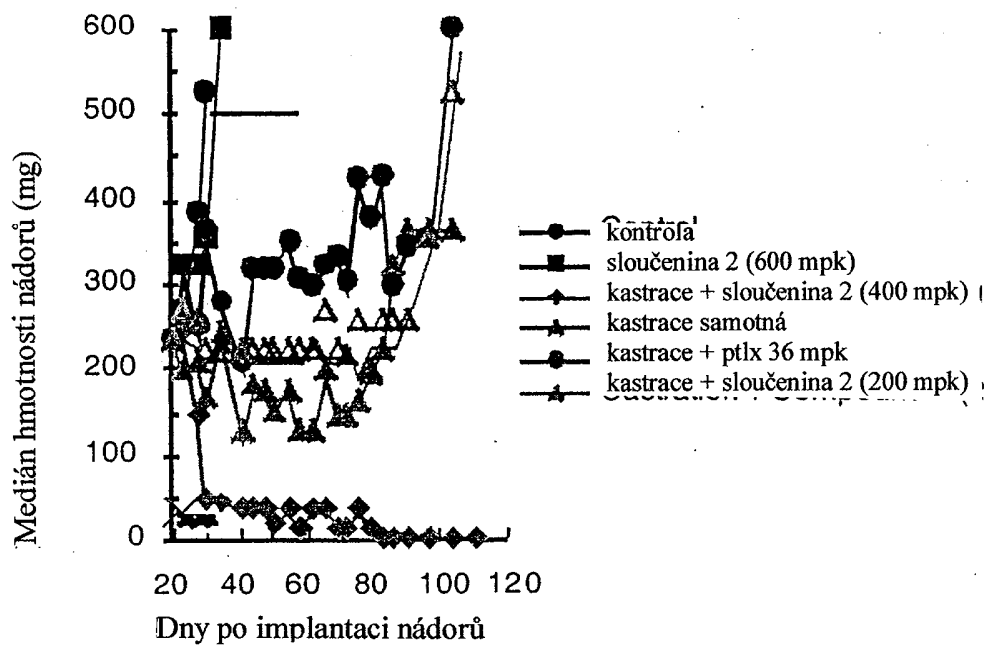
[Handwritten signature]

Dr. Petr Kolářský
advokát

25.02.03

PV 2002-3220

Kombinace sloučenina 2+kastrace

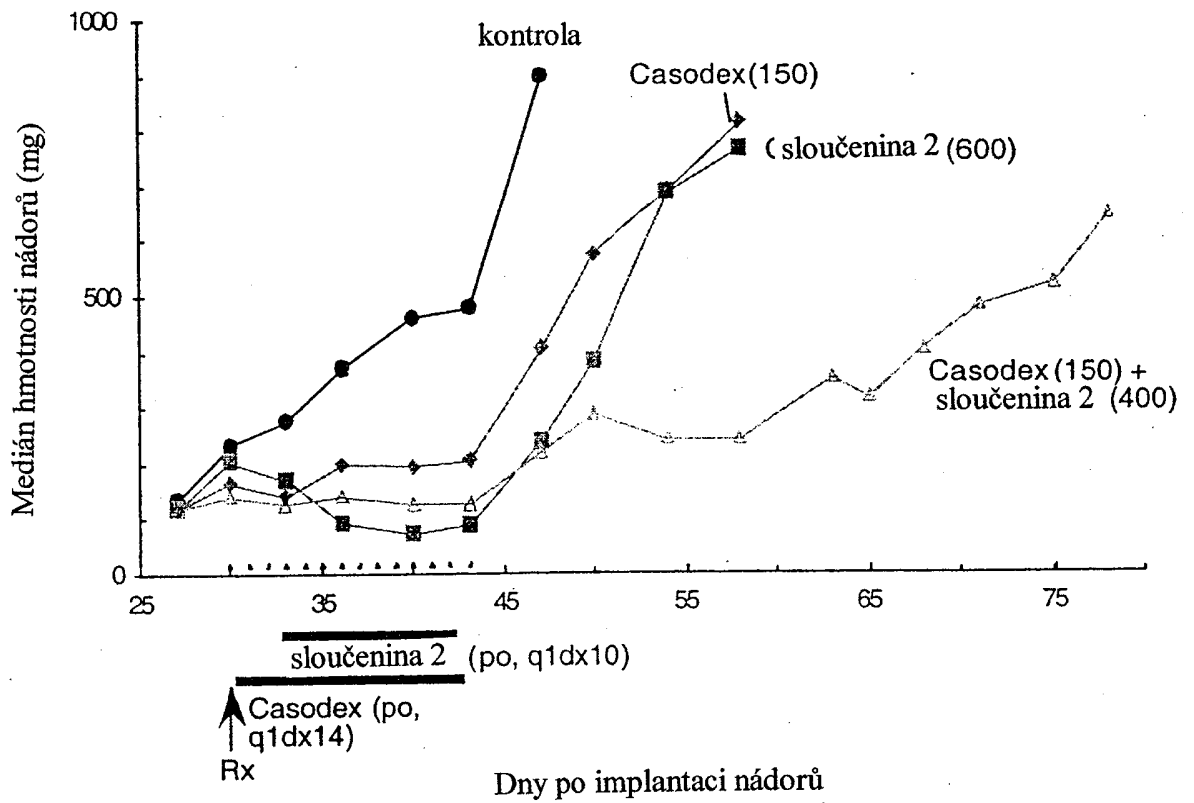


Obr. 21

[Signature]
 JUDr. Petr Kolářský
 odborník

25.02.03

PV 2002-3220



Obr. 22

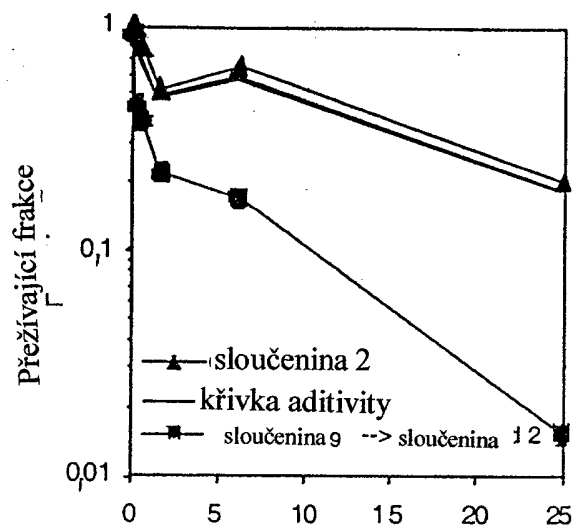
[Handwritten signature]

JUDr. Petr Kálenický
advokát

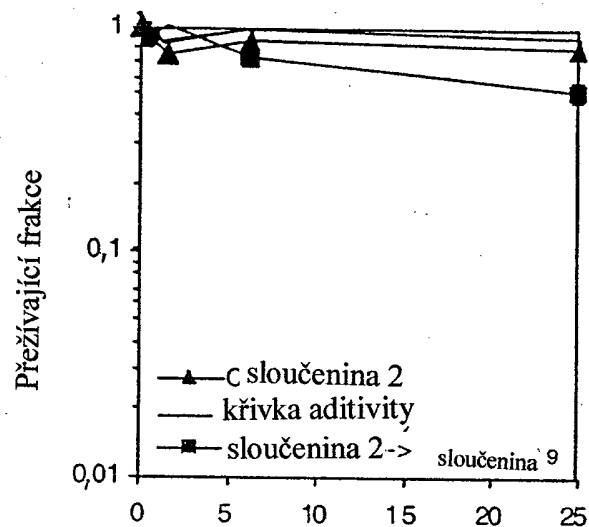
25.02.03

PV 2002-1220

Obr. 23A



Obr. 23B



koncentrace sloučeniny 2 (μM)

[Handwritten signature]

Mgr. Petr Kalenský
01.03.03