



(51) МПК  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 31/517* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*A61K 39/395* (2020.05); *A61K 31/517* (2020.05); *A61K 2121/00* (2020.05); *A61P 35/00* (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2016143153, 09.03.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
09.03.2015

Дата регистрации:  
01.10.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
03.04.2014 US 61/974,765

(43) Дата публикации заявки: 04.05.2018 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 01.10.2020 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 03.11.2016

(86) Заявка РСТ:  
EP 2015/000525 (09.03.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2015/149909 (08.10.2015)

Адрес для переписки:  
105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,  
секция 1, этаж 3, ЕВРОМАРКПАТ

(72) Автор(ы):

ХАК Бейард Р. (US),  
УИЛКЕР Эрик (US),  
МАЧЛ Андреас (US),  
КАЛЕТА Ремигиуш (US)

(73) Патентообладатель(и):  
МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: GARCIA-GARCIA C et al. Dual  
mTORC1/2 and HER2 Blockade Results in  
Antitumor Activity in Preclinical Models of  
Breast Cancer Resistant to Anti-HER2 Therapy.  
CLINICAL CANCER RESEARCH, 2012, vol.  
18, no. 9, p. 2603 - 2612. WO 2012069146 A1,  
31.05.2012. RU 2429006 C2, 20.09.2011.  
VAZQUEZ-MARTIN A et al. Low-scale  
phosphoproteome analyses identify the (см.  
прод.)

R U 2 7 3 3 4 0 1 C 2

(54) КОМБИНАЦИИ ПРОТИВОРАКОВЫХ ЛЕКАРСТВ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно к онкологии, и предназначена для профилактики или лечения рака. Комбинация для профилактики или лечения рака включает амид 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты или его физиологически приемлемые соли и ингибитор Her2, который представляет собой трастузумаб или лапатиниб, или его физиологически приемлемые соли. Кроме того, обеспечивается фармацевтическая композиция, включающая указанную комбинацию и вспомогательные

вещества и/или адьюванты. В другом воплощении, предложен набор для профилактики или лечения рака, состоящий из отдельных упаковок (а) эффективного количества амида 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты или его физиологически приемлемых солей, и (б) эффективного количества трастузумаба или лапатиниба или его физиологически приемлемых солей. Также представлен способ профилактики или лечения рака, включающий введение субъекту амида 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-

R U 2 7 3 3 4 0 1 C 2

фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты или его физиологически приемлемых солей и трастузумаба или лапатиниба или его физиологически приемлемых солей.  
Использование группы изобретений позволяет

повысить эффективность профилактики или лечения рака за счет синергетического действия компонентов указанной комбинации. 4 н. и 4 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb(R)) in human breast carcinoma cells. ANNALS OF ONCOLOGY, 2008, vol. 19, no. 6, p.1097 - 1109.

R U 2 7 3 3 4 0 1 C 2



(51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 31/517* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*A61K 39/395* (2020.05); *A61K 31/517* (2020.05); *A61K 2121/00* (2020.05); *A61P 35/00* (2020.05)

(21)(22) Application: 2016143153, 09.03.2015

(24) Effective date for property rights:  
09.03.2015

Registration date:  
01.10.2020

Priority:

(30) Convention priority:  
03.04.2014 US 61/974,765

(43) Application published: 04.05.2018 Bull. № 13

(45) Date of publication: 01.10.2020 Bull. № 28

(85) Commencement of national phase: 03.11.2016

(86) PCT application:  
EP 2015/000525 (09.03.2015)

(87) PCT publication:  
WO 2015/149909 (08.10.2015)

Mail address:  
105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str. 1,  
sektsiya 1, etazh 3, EVROMARKPAT

(72) Inventor(s):

KHAK Bejard R. (US),  
UILKER Erik (US),  
MACHL Andreas (US),  
KALETA Remigiusz (US)

(73) Proprietor(s):

Merck Patent GmbH (DE)

RU 2733401 C2

R U 2 7 3 3 4 0 1 C 2

(54) COMBINATIONS OF ANTI-CANCER MEDICINES

(57) Abstract:

FIELD: medicine; oncology.

SUBSTANCE: group of inventions is intended for preventing or treating cancer. Combination for preventing or treating cancer involves 4-[*(S*)-2-azetidine-1-yl-1-(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)-ethylamino]-quinazoline-8-carboxylic acid amide or its physiologically acceptable salts and Her2 inhibitor, which is trastuzumab or lapatinib, or its physiologically acceptable salts. In addition, a pharmaceutical composition comprising said combination and adjuvants and/or adjuvants is provided. In another embodiment, a kit for preventing or treating cancer, consisting of separate packages (a) of an effective amount of 4-[*(S*)-2-azetidine-1-yl-1-(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)

-ethylamino]-quinazoline-8-carboxylic acid amide or its physiologically acceptable salts, and (b) an effective amount of trastuzumab or lapatinib or its physiologically acceptable salts. Also disclosed is a method of preventing or treating cancer, comprising administering to a subject amide of 4-[*(S*)-2-azetidine-1-yl-1-(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)-ethylamino]-quinazoline-8-carboxylic acid or its physiologically acceptable salts and trastuzumab or lapatinib or its physiologically acceptable salts.

EFFECT: using the group of inventions enables providing more effective prevention or treatment of cancer by synergistic action of components of said combination.

8 cl, 2 dwg, 1 tbl, 10 ex

R U 2 7 3 3 4 0 1 C 2

R U 2 7 3 3 4 0 1 C 2

Изобретение относится к комбинациям амида 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты (здесь и далее - Соединение А) и/или его физиологически приемлемых солей и сольватов, с ингибиторами рецепторной тирозинкиназы erbB-2, также известной как HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2), и использованию таких комбинаций для лечения рака.

#### Уровень техники

Соединение А, методы его изготовления и его использование в лечении рака описаны в документе WO 2012/069146. Это соединение является новым селективным

сильнодействующим двойным ингибитором p70S6K и Akt, как показано в различных исследованиях на клетках. Было показано, что Соединение А оказывает сильное противоопухолевое воздействие на широкую панель линий раковых клеток. Особенно чувствительными к Соединению А являются клетки рака молочной железы, глиобластомы, эндометриального рака и карциномы яичников.

Протеинкиназы составляют большое семейство структурно родственных ферментов, отвечающих за контроль широкого спектра процессов передачи сигнала в клетке (Hardie, G. and Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book. I and II*, Academic Press, San Diego, CA). Киназы можно поделить на семейства по субстратам, которые ими фосфорилируются (напр., протеин-тироzin, протеин-серин/ треонин, липиды и т.д.)

Распознаны мотивы последовательностей, в целом соответствующие каждому из этих семейств киназ (напр., Hanks, S.K., Hunter, T., FASEB J., 9:576-596 (1995); Knighton, et al., Science, 253:407-414 (1991); Hiles, et al., Cell, 70:419-429 (1992); Kunz, et al., Cell, 73:585-596 (1993); Garcia-Bustos, et al., EMBO J., 13:2352-2361 (1994)).

Протеинкиназы могут быть охарактеризованы механизмами их регуляции. Эти механизмы включают, например, аутофосфорилирование, трансфосфорилирование другими киназами, белок-белковые взаимодействия, белок-липидные взаимодействия, белок-полинуклеотидные взаимодействия. Отдельная протеинкиназа может регулироваться более чем одним механизмом.

С помощью добавления фосфатных групп к белкам-мишеням киназы регулируют множество разных клеточных процессов, включая следующие (но не ограничиваясь ими): пролиферацию, дифференциацию, апоптоз, подвижность, транскрипцию, трансляцию и другие сигнальные процессы. Эти явления фосфорилирования действуют как молекулярные переключатели "вкл./выкл.", которые могут модулировать или регулировать биологическую функцию белка-мишени. Фосфорилирование белков-мишней происходит в ответ на различные внеклеточные сигналы (гормоны, нейромедиаторы, факторы роста и дифференциации и т.п.), события клеточного цикла, стрессы, вызванные условиями окружающей среды или питания и т.д. Надлежащей функцией протеинкиназы в сигнальных путях является активация или инактивация (напрямую или опосредованно), например, метаболического ферmenta, регуляторного белка, рецептора, цитоскелетного белка, ионного канала или насоса, или фактора транскрипции. Неконтролируемое сигнализирование из-за нарушенного контроля фосфорилирования белка связано со многими болезнями, включая, например, воспаление, рак, аллергию/астму, болезни и состояния иммунной системы, болезни и состояния центральной нервной системы, а также ангиогенез.

Протеинкиназа 70S6K, рибосомная протеинкиназа p70S6K массой 70 кДа (также известна как SK6, p70/p85 S6 киназа, p70/p85 рибосомная S6 киназа и pp70S6K), является членом подсемейства протеинкиназ AGC. p70S6K - это серин-треонинкиназа, являющаяся частью метаболического пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) / AKT. p70S6K

находится в этом пути ниже PI3K, и ее активация происходит через фосфорилирование на нескольких участках в ответ на многочисленные митогены, гормоны и факторы роста. Активность p70S6K также находится под контролем комплекса, содержащего mTOR (TORC1), поскольку активность p70S6K ингибируется рапамицином. p70S6K

5 регулируется мишениями PI3K, находящимися дальше по пути - Akt и PKC $\zeta$ . Akt напрямую фосфорилирует и инактивирует TSC2, таким образом активируя mTOR. Кроме этого, исследования мутантных аллелей p70S6K, ингибируемых Вортманнином, но не рапамицином, заставляют предположить, что путь PI3K может оказывать влияние на p70S6K независимо от регуляции активности mTOR.

10 Фермент p70S6K модулирует синтез белка путем фосфорилирования рибосомного белка S6. Фосфорилирование S6 связано с повышенной трансляцией мРНК, кодирующих компоненты трансляционного аппарата, включая рибосомные белки и факторы элонгации трансляции, повышенная экспрессия которых необходима для роста и пролиферации клеток. Эти мРНК содержат на 5' участке начала транскрипции 15 олигопirimидиновый участок (обозначаемый 5'TOP), который, как было доказано, является существенно важным для их регуляции на уровне трансляции.

Кроме участия в трансляции, активация p70S6K также связана с контролем клеточного цикла, дифференциацией нейронных клеток, регуляцией подвижности клеток и клеточным ответом, которые важны для метастазирования опухолей, иммунного ответа 20 и регенерации тканей. Антитела против p70S6K прекращают опосредованное митогенным ответом вхождение фибробластов крысы в фазу S, указывая на то, что функция p70S6K является ключевой для перехода с фазы G1 на фазу S клеточного цикла. Более того, ингибирование пролиферации клеточного цикла на переходе с фазы G1 к 25 фазе S с помощью рапамицина было идентифицировано как последствия ингибирования выработки гиперfosфорилированной, активированной формы p70S6K.

Роль p70S6K в пролиферации опухолевых клеток и защиты клеток от апоптоза основывается на ее участии в передаче сигнала рецепторам фактора роста, их сверхэкспрессии и активации в опухолевых тканях. Например, анализы методами нозерн и вестерн показали, что амплификация гена PS6K сопровождалась соответствующим 30 повышением экспрессии мРНК и белка (Cancer Res. (1999) 59: 1408-11-Localization of PS6K to Chromosomal Region 17q23 and Determination of Its Amplification in BreastCancer).

Хромосома 17q23 амплифицирована в до 20% первичных опухолей молочной железы, в 87% опухолей молочной железы, содержащих мутации BRCA2 и в 50% опухолей, содержащих мутации BRCA1, равно как и в других типах рака, таких как рак 35 поджелудочной железы, рак мочевого пузыря и нейробластома (см. M. Barlund, O. Monni, J. Kononen, R. Cornelison, J. Torhorst, G. Sauter, O.-P. Kallioniemi and Kallioniemi A., Cancer Res., 2000, 60: 5340-5346). Было продемонстрировано, что в амплификации 17q23 при раке молочной железы участвуют гены PAT1, RAD51C, PS6K и SIGMA1B (Cancer Res. (2000): 60, pp. 5371-5375). Ген p70S6K был идентифицирован как цель амплификации 40 и сверхэкспрессии в этой области, также наблюдалась статистически значимая связь между амплификацией и неблагоприятным прогнозом.

Клиническое ингибирование активации p70S6K наблюдалось у пациентов с карциномой почек, получавших лечение CCI-779 (эстер рапамицина), ингибитором предстоящей киназы mTOR. Была отмечена значительная линейная зависимость между 45 прогрессом болезни и ингибированием активности p70S6K.

В ответ на энергетический стресс супрессор опухолей LKB1 активирует AMPK, которая фосфорилирует комплекс TSC1/2, позволяя ему инактивировать метаболический путь mTOR/p70S6K. Мутации в LKB1 вызывают синдром Пейтца-Егерса (СПЕ), при

этом вероятность развития рака у пациентов со СПЕ в 15 раз выше, чем у населения в целом. К тому же, 1/3 легочных adenокарцином содержат инактивирующие LKB1 мутации.

p70S6K связывают с метаболическими болезнями и расстройствами. Сообщалось,

5 что отсутствие p70S6K защищает от вызванного возрастом и рационом ожирения, в то же время повышая чувствительность к инсулину. Роль p70S6K в метаболических болезнях и расстройствах, таких как ожирение, метаболический синдром, инсулинорезистентность, гипергликемия, гипераминоацидемия и гиперлипидемия, подтверждается полученными данными.

10 Соединения, описанные в качестве подходящих для ингибирования p70S6K, раскрыты в документах WO 03/064397, WO 04/092154, WO 05/054237, WO 05/056014, WO 05/033086, WO 05/117909, WO 05/039506, WO 06/120573, WO 06/136821, WO 06/071819, WO 06/131835, WO 08/140947, WO 10/093419, WO 12/013282 и WO 12/069146.

Было продемонстрировано, что Соединение А, ингибирующее не только p70S6K,

15 но и киназу Akt (находится выше по пути PI3K, чем p70S6K), обеспечивает более эффективное блокирование пути PI3K (Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Proc. Natl Acad Sci USA. 2008 Nov 11; 105(45): 17414-9.), а также позволяет предотвратить активацию Akt через петлю обратной связи (Tamburini et al. Blood 2008; 111: 379-82).

Задачей заявляемого изобретения было нахождение способов улучшения

20 фармацевтической полезности Соединения А. Для этого были изучены комбинации Соединения А с ингибиторами HER2 *in vitro* и *in vivo*.

Рецепторная тирозиновая протеинкиназа erbB-2, также известная как CD340 (клuster дифференциации 340) или proto-онкоген Neu, является белком, кодируемым у человека геном ERBB2. Ген ERBB2 также часто именуют HER2 (от human epidermal growth factor receptor - рецептор эпидермального фактора роста человека).

25 HER2 является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR/ERBB). Было показано, что амплификация или сверхэкспрессия этого онкогена играет важную роль в развитии и прогрессировании некоторых агрессивных типов рака молочной железы. В последние годы этот белок стал важным биомаркером и

30 терапевтической мишенью для приблизительно 30% пациентов с раком молочной железы.

Семейство ErbB состоит из четырех связанных с цитоплазматической мембраной рецепторных тирозинкиназ. Все четыре содержат внеклеточный домен связывания лиганда, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, могущий 35 взаимодействовать со множеством сигнальных молекул и проявлять как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую активность. HER2 может образовать гетеродимеры с любым из трех остальных рецепторов и считается предпочтительным партнером димеризации для других рецепторов ErbB.

Димеризация приводит к аутофосфорилированию тирозиновых остатков 40 цитоплазматического домена рецепторов и инициирует ряд сигнальных путей. Другими членами семейства являются рецептор эпидермального фактора роста, erbB-3 (нейромуцин-связывающий; не содержит киназного домена) и erbB-4.

Сигнальные пути, активируемые HER2, включают: митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK) и фосфоинозитид-3-киназу (PI3K/Akt).

45 Резюмируя вышесказанное, сигнализирование через семейство рецепторов ErbB способствует пролиферации клеток и препятствует апоптозу, и таким образом, должно строго регулироваться для предотвращения неконтролируемого роста клеток.

Амплификация или сверхэкспрессия гена ERBB2 происходит в приблизительно 15-

30% случаев рака молочной железы. Она в значительной степени связана с повышенной частотой рецидивов болезни и неблагоприятным прогнозом. Также известно, что сверхэкспрессия случается при раке яичников, желудка и агрессивных формах рака матки, таких как серозная эндометриальная карцинома матки.

5 Более того, были обнаружены различные структурные вариации, вызывающие лиганд-независимый запуск этого рецептора в отсутствие его сверхэкспрессии. HER2 обнаруживается в ряде опухолей, и некоторые из этих опухолей содержат точечные мутации в последовательности, определяющей трансмембранный домен HER2. Замена валина на глутаминовую кислоту в трансмембранном домене может привести к 10 конститutивной димеризации этого белка в отсутствие лиганда.

Авторами данной заявки было неожиданно обнаружено, что Соединение А в комбинации с ингибиторами HER2 проявляет синергическое действие.

Примером ингибитора HER2 является моноклональное антитело трастузумаб (рыночное наименование Герцептин). Трастузумаб - это высокоочищенное 15 рекомбинантное полученное из ДНК гуманизированное моноклональное IgG1-каппа антитело, которое высокоаффинно и специфично связывается со внеклеточным доменом рецептора HER2. Одобрено его использование для лечения рака, в котором обнаружена сверх-экспрессия HER2.

Примером низкомолекулярного ингибитора HER2 является лапатиниб (рыночное 20 наименование Тайверб).

#### Фигуры

Фиг. 1: Оценка влияния комбинации Соединения А с лапатинибом в нескольких линиях раковых клеток.

Значения для Фиг. 1:

Источник	Клеточная линия	Векторная сумма
молочная железа	BT-20	-0,0401
молочная железа	HS578T	0,2342
молочная железа	JIMT-1	-0,8499
молочная железа	MCF-7	-0,2349
молочная железа	MDA-MB-231	0,2126
молочная железа	MDA-MB-436	-0,0763
молочная железа	MDA-MB-468	-0,1157
молочная железа	MT-3	-0,0745
молочная железа	SK-BR-3	-0,9705

Фиг. 2: Оценка влияния комбинации Соединения А с трастузумабом на происходящую от пациента ксенотрансплантатную модель рака молочной железы.

#### Детальное описание изобретения

Предлагаемое изобретение относится к способу профилактики и/или лечения рака, 40 проявляющего сверх-экспрессию HER2 (Her2 + рак), включающего введение субъекту Соединения А и/или его физиологически приемлемых солей и сольватов, а также одного или более ингибиторов Her2.

Соединение А и/или его физиологически приемлемые соли и сольваты и ингибитор Her2 могут быть введены одновременно или последовательно. В случае одновременного 45 введения Соединение А и/или его физиологически приемлемые соли и сольваты и ингибитор Her2 могут быть введены как смесь соединений в одной фармацевтической композиции или как отдельные фармацевтические композиции.

Предпочтительно предлагаемый способ включает применение Соединения А и/или

его физиологически приемлемых солей и сольватов, а также одного ингибитора Her2, вводимых последовательно. Более предпочтительно сначала применять ингибитор Her2.

Предлагаемое изобретение в частности относится к способу профилактики и/или 5 лечения опухолей, выбранных из группы, которая состоит из HER2+ рака молочной железы, аденокарциномы желудка или аденокарциномы гастроэзофагеального соединения. Однако способ лечения относится также к другим HER2+ видам опухолей, отвечающим на трастузумаб, таким как рак мочевого пузыря, рак легких, рак яичников, эндометриальный рак, рак пищевода, рак слюнных желез и т.д., или же другим опухолям, 10 отвечающим на лечение трастузумабом на основании их молекулярного профиля.

Предпочтительно предлагаемые способы лечения относятся к лечению рака, и в частности, выше- и нижеописанных опухолей.

Более того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей смесь соединений активных фармацевтических ингредиентов (АФИ): 15 Соединения А и его физиологически приемлемых солей и сольватов, и одного ингибитора Her2. Если ингибитор Her2 является малой химической молекулой, такой как лапатиниб (в отличие от биологической молекулы, такой как антитело, фрагмент антитела или конъюгат антитела), то смесь соединений в фармацевтической композиции может также содержать физиологически приемлемые соли и сольваты такого низкомолекулярного 20 ингибитора Her2.

Подходящими солями-аддуктами являются неорганические или органические соли всех физиологически или фармакологически приемлемых кислот, например, галиды, в частности, гидрохлориды или гидробромиды, лактаты, сульфаты, цитраты, тартраты, 25 малеаты, фумараты, оксалаты, ацетаты, фосфаты, метилсульфонаты, бензоаты или п-толуолсульфонаты.

Сольваты Соединения А и низкомолекулярных ингибиторов Her2 в контексте данной заявки обозначают аддукты молекул инертного растворителя на Соединении А, образующиеся вследствие силы их взаимного притяжения. Сольватами являются, например, гидраты, такие как моногидраты или дигидраты, или алкоголяты, т.е. 30 продукты присоединения спиртов, таких как, например, метанола или этанола.

Предпочтительной солевой формой Соединения А является его свободное основание. Также предпочтитаются его гидрохлорид, дигидрохлорид, мезилат, сукцинат или малонат-соли.

Термин "эффективное количество" обозначает количество лекарственного средства 35 или фармацевтически активного ингредиента, вызывающего в ткани, системе, животном или человеке искомый или желаемый исследователем или врачом биологический или медицинский ответ.

Кроме того, термин "терапевтически эффективное количество" обозначает 40 количество, принятие которого по сравнению с субъектом, не принимавшим таковое количество, приводит к следующим последствиям: улучшенное лечение, излечивание, предотвращение или устранение болезни, синдрома, состояния, жалобы, расстройства или предотвращение побочных эффектов, или также замедление прогресса болезни, состояния или расстройства. Термин "терапевтически эффективное количество" также охватывает количества, эффективные для повышения нормальной физиологической 45 функции.

Предлагаемая фармацевтическая композиция содержит смеси двух АФИ, например, в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:100 или 1:1000.

Фармацевтическая композиция также содержит по меньшей мере одно твердое,

жидкое и/или полужидкое вспомогательное вещество или адьювант. Таким образом, изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей указанную предлагаемую смесь АФИ и указанные вспомогательные вещества и/или адьюванты.

Более того, предлагаемое изобретение относится к применению указанной

<sup>5</sup> фармацевтической композиции для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

Изобретение также относится к комплекту (набору), состоящему из отдельных упаковок

(а) фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество Соединения

<sup>10</sup> А,

(б) фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество ингибитора Her2 и, необязательно,

(в) фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество третьего средства для лечения рака.

<sup>15</sup> Комплект включает подходящие контейнеры, такие как коробки, индивидуальные флаконы, пакеты или ампулы. Комплект может, к примеру, включать отдельные ампулы, каждая из которых содержит фармацевтическую композицию, включающую эффективное количество Соединения А и/или его фармацевтически применимых солей, фармацевтическую композицию, включающую эффективное количество ингибитора <sup>20</sup> Her2 и/или его фармацевтически применимых солей, а также, необязательно, фармацевтическую композицию, включающую эффективное количество другого противоракового средства в растворенной или лиофилизированной форме.

Противораковое средство, которое может быть скомбинировано с Соединением А и ингибитором Her2, согласно изобретению, может включать один или более, но <sup>25</sup> предпочтительно один, из нижеследующих агентов:

- Алкилирующие агенты, такие как алтетрамин, бендамустин, бусульфан, карmustин, хлорамбуцил, хлорметин, циклофосфамид, дакарбазин, ифосфамид, импросульфан тозилат, ломустин, мелфалан, митобронитол, митолактол, нимустин, ранимустин, темозоломид, тиотепа, треосульфан, мехлорэтамин, карбоквон, апазиквон, фотемустин, <sup>30</sup> глюфосфамид, палифосфамид, пипроброман, трофосфамид, урамустин;

- Соединения платины, такие как карбоплатин, цисплатин, эптаплатин, мириплатин гидрат, оксалиплатин, лобаплатин, недаплатин, никоплатин, сатраплатин;

- Агенты, изменяющие ДНК, такие как амрубицин, бисантрен, децитабин, митоксантрон, прокарбазин, трабектедин, клофарабин, амсакрин, бросталлицин, <sup>35</sup> пиксантрон, ларомустин;

- Ингибиторы топоизомеразы, такие как этопозид, иринотекан, разоксан, собузоксан, тенипозид, топотекан, амонафид, белотекан, эллиптиниума ацетат, ворелоксин;

- Модификаторы микротрубочек, такие как кабазитаксел, доцетаксел, эрибулин, иксабепилон, паклитаксел, винбластин, винкристин, винорельбин, виндесин, винфлунин, <sup>40</sup> фосбretабулин, тесетаксел;

- Антиметаболиты, такие как аспарагиназа, азаситидин, кальция левофолинат, капекитабин, кладрибин, цитарабин, эноцитабин, флоксуридин, флударабин, фторурацил, гемцитабин, меркаптопурин, метотрексат, неларабин, пеметрексед, пралатрексат, азатиоприн, тиогуанин, кармофур, доксифлуридин, элацитарабин, ралтирексед, <sup>45</sup> сапацитабин, тегафур, триметрексат;

- Противораковые антибиотики, такие как блеомицин, дактиномицин, доксорубицин, эпирюбичин, идарубицин, левамизол, мильтефозин, митомицин С, ромидепсин, стрептозоцин, валрубицин, зиностатин, зорубицин, даунуробицин, пликамицин,

акларубицин, пепломицин, пирапубицин;

- Гормоны/антагонисты, такие как абареликс, абиратерон, бикалутамид, бусерелин, калустерон, хлоротрианизен, дегареликс, дексаметазон, эстрадиол, флуокортолон, флуоксиместерон, флутамид, фульвестрант, госерелин, гистрелин, лейпрофелин,

<sup>5</sup> мегестрол, митотан, нафарелин, нандролон, нилутамид, октреотид, преднизолон, ралоксифен, тамоксифен, тиротропин альфа, торемифен, трилостан, трипторелин, диэтилстилбестрол, аколбилен, даназол, деслорелин, эпитиостанол, ортеронел, энзалутамид;

- Ингибиторы ароматазы, такие как аминоглютетимид, анастрозол, эксеместан,

<sup>10</sup> фадрозол, летрозол, тестолактон, форместан;

- Низкомолекулярные ингибиторы киназ, такие как кризотиниб, дасатиниб, эрлотиниб, иматиниб, лапатиниб, нилотиниб, пазопаниб, регорафениб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, вандетаниб, vemурафениб, босутиниб, гефитиниб, акситиниб, афатиниб, алисертиб, дабрафениб, дакомитиниб, динациклиб, довитиниб, энзастаурин,

<sup>15</sup> нинтеданиб, ленватиниб, линифаниб, линситиниб, маситиниб, мидостаурин, мотесаниб, нератиниб, орантиниб, перифозин, понатиниб, радотиниб, ригосертиб, типифарниб, тивантиниб, тивозаниб, траметиниб, пимасертиб, бриваниб аланинат, цедираниб, апатиниб, кабозантиниб S-малат, карфилзомиб, ибрутиниб, икотиниб;

- Фотосенсибилизаторы, такие как метоксален, порфимер натрия, талапорфин,

<sup>20</sup> темопорфин;

- Антитела, такие как алемтузумаб, бесилесомаб, брентуксимаб ведотин, цетуксимаб, деносумаб, ипилимумаб, офатумумаб, панитумумаб, ритуксимаб, тоситумомаб, трастузумаб, бевацизумаб, катумаксомаб, элотузумаб, эпратузумаб, фарлетузумаб, могамулизумаб, нецитумумаб, нимотузумаб, обинутузумаб, окаратузумаб, ореговомаб,

<sup>25</sup> рамуцирумаб, рилотумумаб, силтуксимаб, тоцилизумаб, залутумумаб, занолимумаб, матузумаб, далотузумаб, онартузумаб, пертузумаб, ракотумомаб, табалумаб;

- Цитокины, такие как альдеслейкин, интерферон альфа, интерферон альфа2а, интерферон альфа2б, тасонермин, тецелейкин, опрелвекин;

- Лекарственные конъюгаты, такие как денилейкин дифтилокс, ибритумомаб

<sup>30</sup> тиуксетан, иобенгуан I123, преднимустин, трастузумаб эмтансин, эстрамустин, гемтузумаб озогамицин, афлиберцепт, цинтредексин бесудотокс, эдотреотид, инотузумаб озогамицин, наптумомаб эстафенатокс, опортузумаб монатокс, технеций (99mTc) арцитумомаб, винтафолид;

- Вакцины, такие как сипулейцел, витеспен, эмепепимут-S, онкоВАКС, риндопепимут,

<sup>35</sup> троВакс, стимувакс;

- Различные агенты, такие как алитретиноин, бексаротен, бортезомиб, эверолимус, ибандроновая кислота, имиквимод, леналидомид, лентинан, метирозин, мифамуртид, памидроновая кислота, пегаспаргаза, пентостатин, сипулейцел, сизофиран, тамибаротен, темсиролимус, талидомид, третиноин, висмодегиб, золедроновая кислота, талидомид,

<sup>40</sup> вориностат, целекоксиб, циленгитид, энтиностат, этанидазол, ганетеспид, идроноксил, инипариб, иксазомиб, лонидамин, ниморазол, панобиностат, перетиноин, плитидепсин, помалидомид, прокодазол, ридафоролимус, тасквинимод, телотристат, тимальфазин, тирапазамин, тоседостат, трабедерсен, убенимекс, вальсподар, гендицин, пицибанил, реолизин, ретаспимицина гидрохлорид, требананиб, вирулизин.

<sup>45</sup> Особенно предпочтительными партнерами для комбинирования с Соединением А и ингибитором Her2 являются ингибиторы Her3, такие как ММ-121 (полностью гуманизированное антитело против Her3, специфически блокирующее связывание HRG1 - (полипептид I типа нейромулина-1) с Her3, ММ-111 (биспецифическое антитело,

связывающееся с двумя разными целевыми белками, ErbB2 и ErbB3) или U3-1287 (AMG888, первое полностью гуманизированное моноклональное антитело Her3), или нанотела Her3, описанные в документе WO 2011/144749.

Предлагаемые соединения и смеси соединений могут быть адаптированы для введения любым желаемым подходящим способом, например, пероральным (включая трансбукиальный или сублингвальный), ректальным, назальным, местным (включая трансбукиальный, сублингвальный или трансдермальный), вагинальным или парентеральным (включая подкожный, внутримышечный, внутривенный или внутрикожный). Такие лекарственные средства могут быть приготовлены с использованием всех процессов, известных в фармацевтической отрасли, например, комбинированием активного ингредиента со вспомогательным веществом (-ами) или адьювантом (-ами).

Соединения и смеси соединений, адаптированные для перорального введения, могут быть введены как отдельные элементы, такие как, например, капсулы или таблетки; порошки или гранулы; растворы или суспензии в водных или безводных жидкостях; съедобные пены или пенообразная пища; или же жидкие эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле".

Таким образом, например, в случае перорального введения в форме таблетки или капсулы соединение или смеси соединений могут быть скомбинированы с оральным, нетоксичным и фармацевтически приемлемым инертным вспомогательным веществом, таким как, например, этанол, глицерин, вода и другие им подобные. Порошки готовят путем измельчения соединения до подходящего мелкого размера и смешивания его с фармацевтическим вспомогательным веществом, измельченным таким же образом, таким как, например, съедобный углевод, такой как, например, крахмал или маннитол. Также могут присутствовать вкусоароматическая добавка, консервант, диспергатор и краситель.

Капсулы изготавливают приготовлением порошковой смеси, как описано выше, и наполнением этой смесью формируемых желатиновых оболочек. Скользящие и смазывающие вещества, такие как, например, мелкодисперсная кремниевая кислота, тальк, стеарат магния, стеарат кальция или полиэтиленгликоль в твердой форме, могут быть добавлены в порошковую смесь перед операцией наполнения. Могут также быть добавлены разрыхлитель или солюбилизатор, такие как, например, агар-агар, карбонат кальция или карбонат натрия, с целью улучшить биодоступность соединения или смесей соединений после приема капсулы.

Дополнительно, в случае желания или необходимости, в смесь также могут быть добавлены подходящие связывающие, смазывающие вещества, разрыхлители и красители. Подходящие связывающие вещества включают крахмал, желатин, природные сахара, такие как, например, глюкоза или бета-лактоза, кукурузные подсластители, природную и синтетическую камедь, такую как, например, гуммиарабик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, воски и т.п. Смазывающие вещества, используемые в этих лекарственных формах, включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Разрыхлители включают (но не ограничиваются ими) крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит, ксантановую камедь и т.п. Таблетки изготавливают, например, подготовкой порошковой смеси, гранулированием или сухим прессованием смеси, добавлением смазывающего вещества и разрыхлителя и прессованием всей смеси для получения таблеток. Порошковую смесь готовят смешиванием измельченного подходящим образом соединения с разбавителем или основой, как описано выше, и

необязательно - со связывающим веществом, таким как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинат, желатин или поливинилпиролидон, замедлителем растворения, таким как, например, парафин, ускорителем абсорбции, таким как, например, четвертичная соль, и/или поглотителем, таким как, например, бентонит, каолин или дикальция фосфат. Порошковая смесь может быть гранулирована путем смачивания ее связывающим веществом, таким как, например, сироп, крахмальный клейстер, аравийская камедь или растворы целлюлозы или полимерных материалов, и прессования через сито. В качестве альтернативы грануляции порошковую смесь можно пропустить через таблет-пресс с получением неровных комков, которые разбивают для получения гранул. Гранулы могут быть смазаны добавлением стеариновой кислоты, соли-стеарата, талька или минерального масла с целью предотвращения их налипания на формы таблет-пресса. Смазанную смесь прессуют в таблетки. Предлагаемые соединения и смеси соединений могут также быть скомбинированы с легкосыпучим инертным вспомогательным веществом и спрессованы напрямую в таблетки без выполнения операций гранулирования или сухого прессования. Может присутствовать прозрачный или непрозрачный защитный слой, состоящий из герметизирующего слоя шеллака, слоя сахара или полимерного материала и глянцевого слоя воска. К подобным покрытиям могут быть добавлены красители с целью различия форм выпуска.

Жидкости для перорального приема, такие как, например, растворы, сиропы и настойки, могут быть приготовлены в таких формах выпуска, чтобы определенное количество жидкости содержало предписанное количество соединения. Сиропы могут быть приготовлены путем растворения соединений и смесей соединений в водном растворе с подходящей вкусоароматической добавкой, в то время как настойки готовят с использованием нетоксичной спиртовой основы. Суспензии могут быть приготовлены путем диспергирования соединения в нетоксичной основе. Могут также быть добавлены солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты и полиоксиэтилен-сорбитоловые эфиры, консерванты, вкусоароматические добавки, такие как, например, масло перечной мяты, или натуральные подсладители или сахарин или другие искусственные подсладители и т.п.

Составы форм выпуска для перорального введения могут, при желании, быть включены в микрокапсулы. Композиции могут быть также приготовлены с продленным или замедленным высвобождением лекарственного вещества, например, с покрытием или включением дисперсного материала в полимеры, воск и т.п.

Предлагаемые соединения и смеси соединений, а также их соли и сольваты, могут быть также введены в форме систем липосомной доставки, таких как, например, малые моноламеллярные везикулы, крупные моноламеллярные везикулы и мультиламеллярные везикулы. Липосомы могут быть сформированы из различных фосфолипидов, таких как, например, холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины.

Предлагаемые соединения и смеси соединений могут также быть доставлены с использованием моноклональных антител в качестве индивидуальных носителей, с которыми соединяются молекулы соединений. Соединения и смеси соединений могут также быть присоединены к растворимым полимерам как таргетным носителям лекарственных средств. Такие полимеры могут включать поливинилпиролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакриламидофенол, полигидроксиэтилспартамидофенол или полиэтилен оксид полилизин, замещенный пальмитоиловыми радикалами. Соединения могут кроме этого быть присоединены к биоразлагаемым полимерам, подходящим для достижения контролируемого

высвобождения лекарственного средства, например, полилактиду, поли-эпсилон-капролактону, полигидроксибутановой кислоте, полиортогоэфиром, полиацеталям, полидигидроксирианам, полицианоакрилатам и сшитым или амфипатическим блочным сополимерам гидрогелей.

5 Соединения и смеси соединений, адаптированные для трансдермального введения, могут быть применены как независимые пластиры для продолжительного близкого контакта с эпидермисом пациента. Таким образом, например, активный ингредиент может быть доставлен из пластиря путем ионофореза, как в общем виде описано в документе Pharmaceutical Research, 3(6):318, 1986.

10 Соединения и смеси соединений, адаптированные для местного введения, могут быть изготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, пудр, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел.

Для лечения глаз или другой внешней ткани, например, рта и кожи, композиции предпочтительно применяют в виде местной мази или крема. В случае формулирования 15 композиции в виде мази соединения или смеси соединений могут применяться с парафиновой или водорастворимой кремовой основой. В качестве альтернативы, соединения или смеси соединений могут быть изготовлены в форме крема на основе "масло в воде" или "вода в масле".

Соединения или смеси соединений, адаптированные для местного применения к 20 глазам, включают глазные капли, в которых активный ингредиент растворен или суспендирован в подходящем носителе, в частности водном растворителе.

Соединения и смеси соединений, адаптированные для местного применения во рту, включают леденцы, пастилки и ополаскиватели для рта.

Соединения и смеси соединений, адаптированные для ректального применения, могут 25 быть введены в форме суппозиториев или клизм.

Соединения и смеси соединений, адаптированные для назального применения, в которых субстанция-носитель является твердой, содержат крупный порошок с размером частиц, например, в диапазоне 20-500 микрон, и применяются тем же способом, которым 30 нюхают табак, т.е. резким вдыханием через носовые проходы из контейнера, содержащего порошок и придерживаемого близко к носу. Подходящие для введения в качестве назального спрея или капель для носа композиции, с жидкостью в качестве субстанции-носителя, включают растворы активного ингредиента в воде или масле.

Соединения и смеси соединений, адаптированные для применения путем вдыхания, включают тонкодисперсные пудры или аэрозоли, которые могут быть получены с 35 помощью различных видов аэрозольных дозаторов под давлением, небьюлайзеров или инсуфляторов.

Соединения и смеси соединений, адаптированные для вагинального введения, могут применяться в форме пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев.

Соединения и смеси соединений, адаптированные для парентерального введения, 40 включают водные и безводные стерильные инъекционные растворы, содержащие антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, с помощью которых композицию делают изотоничной крови реципиента, получающего лечение; а также водные и безводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспензионные среды и загустители. Композиции могут применяться в контейнерах, содержащих одну 45 или несколько доз, например, в запаянных ампулах или флаконах, и храниться в вымороженном (лиофилизированном) состоянии, так что необходимо лишь добавление непосредственно перед использованием стерильной жидкости-носителя, например, инъекционной воды. Инъекционные растворы и суспензии, приготовленные в

соответствии с рецептом, могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Совершенно очевидно, что кроме вышеперечисленных компонентов, лекарственные средства согласно изобретению могут содержать также другие агенты, использование которых принято в данной отрасли для определенного типа фармацевтических композиций; так, например, соединения или смеси соединений, подходящие для перорального введения, могут содержать ароматизаторы.

Терапевтически эффективное количество соединения или смеси соединений согласно предлагаемому изобретению зависит от ряда факторов, включающих, например, возраст и вес реципиента, точное определение состояния, требующего лечения, и степени его тяжести, природу композиции и способ введения, и окончательно определяется лечащим врачом или ветеринаром. Однако в общем случае эффективное количество АФИ для лечения болезней согласно изобретению находится в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг массы тела реципиента (млекопитающего) в день и особенно характерно - в диапазоне от 1 до 10 мг/кг массы тела в день. Таким образом, фактическое количество на взрослого млекопитающего массой 70 кг обычно составляет от 70 до 700 мг, и может быть введено одной отдельной дозой в день или, что более привычно, серией частичных доз (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью частями) в день, с сохранением суммарной дневной дозы. Эффективное количество соли или сольватата или их физиологически функционального производного может быть определено как часть эффективного количества соединений и смеси соединений согласно изобретению как таковому.

Предлагаемые фармацевтические препараты могут использоваться как лекарственные средства в медицине человека и ветеринарной медицине. Подходящими вспомогательными веществами являются органические или неорганические субстанции, которые подходят для энтерального (например, перорального), парэнтального или местного введения и не реагируют с новыми соединениями, например, вода, растительные масла, бензиловые спирты, полиэтиленгликоли, желатин, углеводы, такие как лактоза или крахмал, стеарат магния, тальк или вазелин. Для энтерального введения подходят, в частности, таблетки, таблетки с покрытием, капсулы, сиропы, соки, капли или суппозитории, для парэнтального введения подходят растворы, предпочтительно на основе масел или на водной основе, а также суспензии, эмульсии или имплантаты, а для местного применения подходят мази, кремы или пудры. Соединения и смеси соединений могут также быть лиофилизированы, а полученные лиофилизаты использованы, например, для изготовления инъекционных препаратов.

Означенные препараты могут быть стерилизованы и/или содержать адьюванты, такие как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы и/или смачивающие агенты, эмульгаторы, соли для изменения осмотического давления, буферные вещества, красители, вкусоароматические добавки и/или ароматизаторы. При необходимости они также могут содержать один или более дополнительных активных ингредиентов, например, один или более витаминов.

#### Примеры

Нижеприведенные примеры касаются фармацевтических препаратов:

##### Пример A1: Флаконы для инъекций

Раствор 100 г соединения или смеси соединений согласно изобретению и 5 г динатрия

45 гидрофосфата в 3 л бидистиллированной воды доводят до pH 6,5 с помощью 2N соляной кислоты, стерилизуют фильтрацией, разливают по флаконам для инъекций, лиофилизируют и запаивают в стерильных условиях. Каждый флакон для инъекций содержит 5 мг активных ингредиентов.

**Пример А2: Суппозитории**

20 г соединения или смеси соединений согласно изобретению растапливают с 100 г соевого лецитина и 1400 г какао-масла, разливают в формы и оставляют для застывания. Каждый суппозиторий содержит 20 мг активных ингредиентов.

**Пример А3: Раствор**

1 г соединения или смеси соединений согласно изобретению, 9,38 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 28,48 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  и 0,1 г бензалкония хлорида растворяют в 940 мл бидистиллированной воды. pH доводят до 6,8, объем раствора доводят до 1 л и стерилизуют облучением. Такой раствор может быть использован в качестве глазных капель.

**Пример А4: Мазь**

500 мг соединения или смеси соединений согласно изобретению смешивают с 99,5 г вазелина в асептических условиях.

**Пример А5: Таблетки**

15 1 кг соединения или смеси соединений согласно изобретению, 4 кг лактозы, 1,2 кг картофельного крахмала, 0,2 кг талька и 0,1 кг стеарата магния прессуют в таблетки обычным способом таким образом, чтобы каждая таблетка содержала 10 мг активных ингредиентов.

**Пример А6: Таблетки с покрытием**

20 Таблетки изготавливают прессованием аналогично Примеру А5 и затем обычным способом наносят покрытие, состоящее из сахарозы, картофельного крахмала, талька, трагаканта и красителя.

**Пример А7: Капсулы**

25 2 кг соединения или смеси соединений согласно изобретению вводят в капсулы из твердого желатина обычным способом таким образом, чтобы каждая капсула содержала 20 мг активных ингредиентов.

**Пример А8: Ампулы**

30 Раствор 1 кг соединения или смеси соединений согласно изобретению в 60 л бидистиллированной воды разливают в ампулы, лиофилизируют в асептических условиях и запаивают в стерильных условиях. Каждая ампула содержит 10 мг активных ингредиентов.

Нижеприведенные примеры касаются исследований комбинаций с использованием Соединения А и ингибиторов Her2.

35 Пример В1: Комбинация Соединения А с лапатинибом в девяти клеточных линиях рака молочной железы человека

Методика проведения эксперимента для исследования культуры клеток и ингибирования роста:

40 Клеточные линии выращивали в среде, рекомендованной поставщиками, в присутствии 100 ЕД/мл пенициллина G и 100 мкг/мл стрептомицина, дополненной 10% FCS (сыворотка крови эмбрионов коров) (PAN, Германия).

Рост и обработку клеток осуществляли на 96-луночных микротитрационных планшетах. Клетки, собранные в экспоненциальной фазе роста культур с помощью трипсинизации, высевали в 190 мкл среды в оптимальных посевных концентрациях. Оптимальные посевные концентрации для каждой клеточной линии определяли так, чтобы обеспечить их экспоненциальный рост на протяжении эксперимента. Все клетки, выращиваемые без противораковых агентов, к концу обработки визуально оценивались как почти конфлюэнтные. Разведения соединения в ДМСО осуществляли на 96-луночных жестких ПЦР-планшетах. Соединения затем разводили в среде RPMI в соотношении

1:50. 190 мкл клеток после 24-часового предростового периода обрабатывали 10 мкл среды, содержащей соединение (с конечной концентрацией ДМСО 0,1%). Клетки выращивали при температуре 37°C на протяжении 72 часов. Кроме этого, во всех экспериментах несколько планшетов с клетками подвергали обработке для измерений сразу же после 24-часового периода восстановления. Эти планшеты содержали информацию о количестве клеток до лечения, в нулевой точке отсчета времени, и служили для расчета цитотоксичности и/или эффекта ингибирования роста. После обработки клетки осаждали добавлением 10% ТСА. До фиксирования среду отсасывали способом, описанным в [Pauwels et al., 2003]. После часовой инкубации при 4°C планшеты промывали дважды 400 мкл дезионизированной воды. Затем клетки окрашивали 100 мкл 0,08%-го масс./об. SRB. Планшеты оставляли не менее чем на 30 минут и шестикратно промывали 1%-й уксусной кислотой для удаления несвязавшегося красителя [Vichai and Kirtikara, 2006]. Планшеты оставляли высыхать при комнатной температуре и солюбилизировали связанный SRB в 100 мкл 10 мМ основания Трис.

15 Измерение оптической плотности проводили при длине волны 560 нм на планшет-ридере Victor 2 (Perkin Elmer, Germany).

#### План эксперимента:

Перед исследованиями комбинаций *in vitro* активность отдельных агентов исследовали на панели из 80 клеточных линий. Этот диапазон концентраций позволил подобрать 20 диапазоны концентраций для конкретных клеточных линий. Комбинации тестировали путем объединения матриц концентраций Лапатиниба и Соединения А на 96-луночном планшете. Агенты добавляли в лунки одновременно.

Использованные концентрации соединений перечислены в таблице ниже:

Концентрации соединений, моль [M]	
Лапатиниб	Соединение А
0,00E+00	0,000E+00
2,50E-07	1,000E-07
5,00E-07	2,000E-07
1,00E-06	4,000E-07
2,00E-06	8,000E-07
4,00E-06	1,600E-06
8,00E-06	3,200E-06

Попарные комбинации Соединения А с Лапатинибом тестировали на всех клеточных линиях, используя матрицу 6×6. Скрининг был спланирован так, чтобы определить потенциально синергические комбинации. Для планирования исследования использовали всю матрицу 6×6 и/или ее часть.

Методики расчета синергии описаны в [Berenbaum, 1989]. Рассчитывали следующие параметры:

40  $\delta_i = \text{Измеренное значение}_i - \text{Теоретическое значение}_i$

где  $i=[1..n]$  - одно из значений используемой матрицы, и теоретическое значение  $i$  рассчитано как для способа независимого анализа Блисса [Berenbaum, 1989].

Векторную сумму определяли как

45 Векторная сумма  $= \sum_{i=1}^n \text{Sign}(Effect_i) Effect_i^2$

в этом плане Векторная сумма представляет собой скорее скалярную величину

$$\text{Средняя векторная сумма} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Effect_i = Mean(Effect_i)$$

Средние значения ниже -0,5 означают сильный эффект синергии: (-0,5, -0,02] - эффект синергии, (-0,02, 0,02) - нет эффекта (простое сложение эффектов), (0,02, 0,5) - потенциальный антагонизм, и выше 0,5 - сильный антагонизм.

#### Литература

M.C. Berenbaum. What is synergy? Pharmacol Reviews, 41:93-141, 1989.

Bea Pauwels, Annelies E.C. Korst, Christel M.J. de Pooter, Greet G.O. Pattyn, Hilde A.J. Lambrechts, Marc F.D. Baay, Filip Lardon, and Jan B. Vermorken. Comparison of the sulforhodamine b assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. Cancer chemotherapy and pharmacology, 51: 221-226, Mar 2003.

Vanicha Vichai and Kanyawim Kirtikara. Sulforhodamine b colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature protocols, 1:1112-1116, Aug 2006.

Пример В2: Комбинация Соединения А и Трастузумаба на происходящей от пациента ксенотрансплантатной модели рака молочной железы

Самкам бесшерстных мышей (Harlan; nu/nu) между 5 и 7 неделей возраста подкожно имплантировали фрагменты опухоли из полученной от Her2+ пациента модели рака молочной железы "CTG-0033" (пассаж 3, т.е. эта модель была трижды серийно пассирована/выращена от начального хозяина), собранной у животных-хозяев. Когда опухоли у животных-хозяев достигали 1-1,5 см<sup>3</sup>, их собирали для реимплантации животным, используемым в исследовании эффективности. Когда опухоли CTG-0033 (пассаж 4) достигали около 190 мм<sup>3</sup>, животных рандомизировали по объему опухоли по группам лечения или контроля (n=10), и в День 0 начинали дозирование. Лечение производили Основой (Солевым раствором), Соединением А 30 мг/кг QD (в день) РО (перорально), Герцептином (ударная доза 30 мг/кг, поддерживающая доза 15 мг/кг) QW (в неделю) IV (внутривенно), и Соединением А 30 мг/кг QD РО в комбинации с Герцептином 15 мг/кг QW IV. Объемы опухолей замеряли дважды в неделю. Группа лечения солевым раствором была умерщвлена на 55 день по причине больших опухолей. Другим группам лечение прекратили на 75 день и позволили опухолям отрастать на протяжении 2 месяцев, когда мыши не получали никакого лечения. В этом исследовании погибло 2 животных. Одно животное в группе Соединения А умерло на 9 день предположительно из-за ошибки в питании, а другое - в группе Соединения А + Герцептина из-за ошибки персонала.

Лечение Соединением А в дозе 30 мг/кг (группа монотерапии) вызвало 50% регрессию опухоли, в то время как лечение Соединением А + Герцептином вызвало 78% регрессию на 55 день. Лечение Герцептином вызвало %T/C 37 на 55 день. Лечение Соединением А + Герцептином значительно ингибировало рост опухолей по сравнению с отдельными агентами Герцептином и Соединением А (P<.05; 2 Way RM-ANOVA Bonferroni Post Hoc Test) на 55 день. В то время как лечение в группе основы было прекращено, другие животные продолжали получать Соединение А, Герцептин или Соединение А + Герцептин до 75-го дня, после чего опухолям позволили отрасти. На 76 день лечение Соединением А вызвало -66% регрессию, тогда как группа комбинированного лечения регрессировала полностью (объемы опухолей меньше 40 мм<sup>3</sup>). После 71-дневного периода отрастания после прекращения лечения, 6 опухолей из числа пролечиваемых Соединением А отросли, тогда как из числа пролечиваемых комбинацией опухолей не отросла ни одна. Эта разница в отрастании опухолей, пролечиваемых Соединением А по сравнению с Соединением А и Герцептином была статистически значимой

(суммарный логарифмический ранговый критерий  $p < .05$ ). Все животные в группе комбинированного лечения были сочтены излеченными, так как опухоли не отрастали.

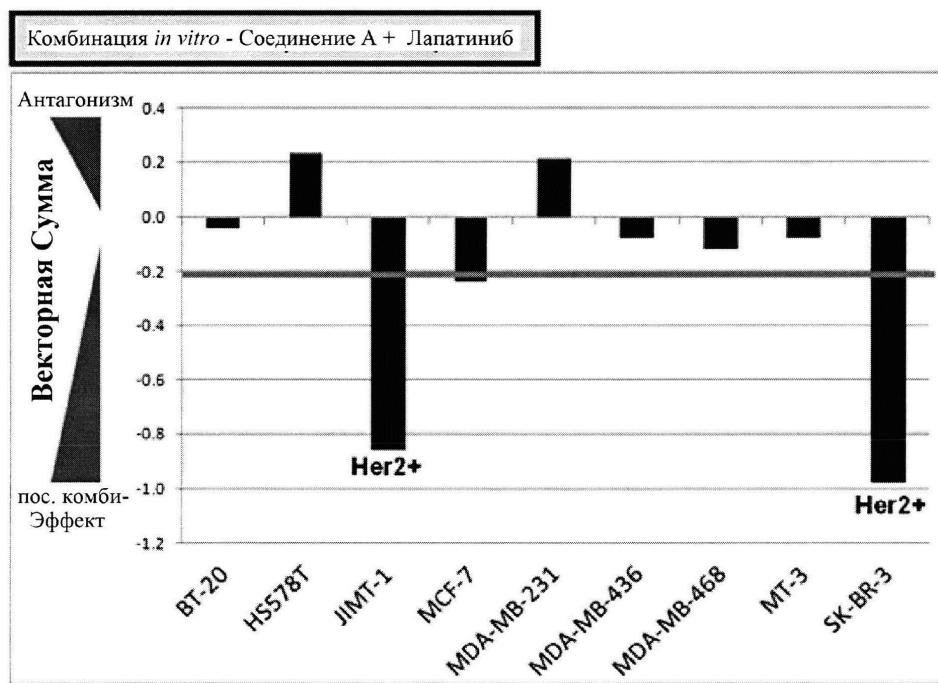
(57) Формула изобретения

- 5 1. Комбинация для профилактики или лечения рака, включающая амид 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты или его физиологически приемлемые соли и ингибитор Her2, который представляет собой трастузумаб или лапатиниб, или его физиологически приемлемые соли.
- 10 2. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения рака, включающая комбинацию по п. 1, а также вспомогательные вещества и/или адьюванты.
- 15 3. Набор для профилактики или лечения рака, состоящий из отдельных упаковок
  - (а) эффективного количества амида 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты или его физиологически приемлемых солей и
  - (б) эффективного количества ингибитора Her2, который представляет собой трастузумаб или лапатиниб, или его физиологически приемлемых солей.
- 20 4. Способ профилактики или лечения рака, включающий введение субъекту амида 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты или его физиологически приемлемых солей и ингибитора Her2, который представляет собой трастузумаб или лапатиниб, или его физиологически приемлемых солей.
- 25 5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что рак является раком молочной железы человека.
- 30 6. Способ по п. 4 или 5, отличающийся тем, что амид 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты и ингибитор Her2 вводят одновременно.
7. Способ по п. 4 или 5, отличающийся тем, что амид 4-[(S)-2-азетидин-1-ил-1-(4-хлор-3-трифторметил-фенил)-этиламино]-хиназолин-8-карбоновой кислоты и ингибитор Her2 вводят последовательно.
- 35 8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что сначала вводят ингибитор Her2.

35

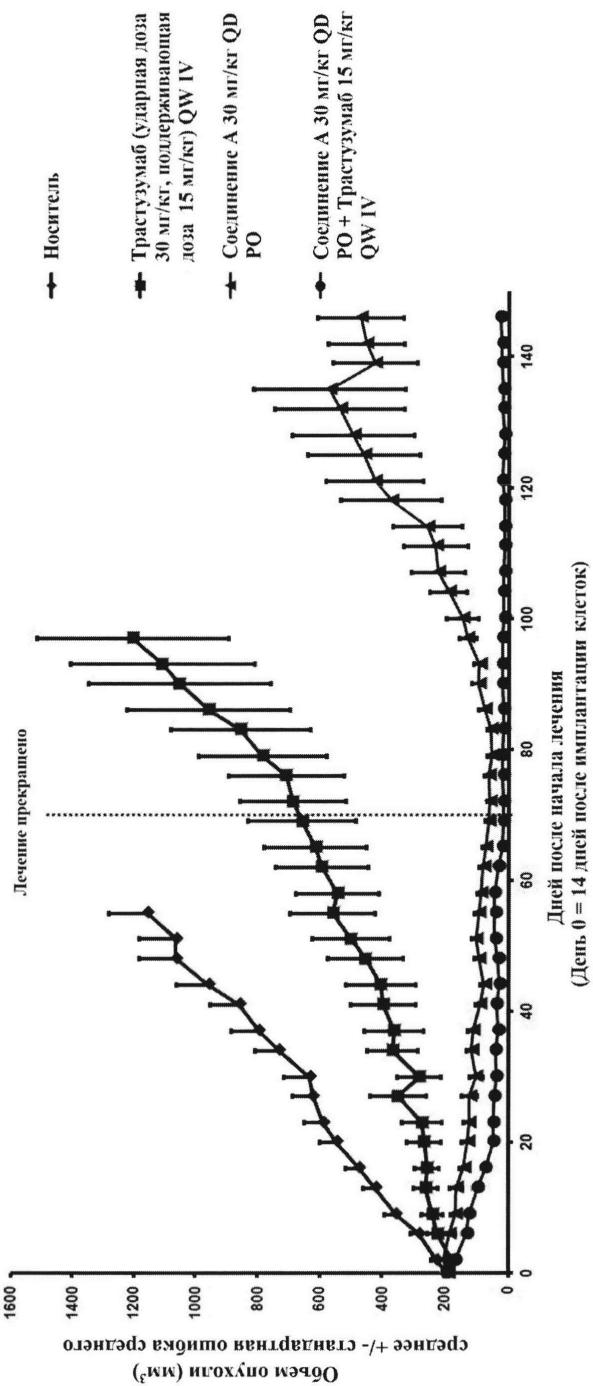
40

45



Оценка влияния комбинации Соединения А с лапатинибом на несколько линий раковых клеток.

**Фигура 1**



Фигура 2