

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

018579

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2013.09.30**

(21) Номер заявки: **201001164**

(22) Дата подачи: **2008.12.23**

(51) Int. Cl. **A61K 31/4375** (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛИПОВ/ПОЛИПОЗА И ПРЕДРАКОВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

(31) **61/006,459**

(32) **2008.01.15**

(33) **US**

(43) **2010.12.30**

(86) **PCT/EP2008/011088**

(87) **WO 2009/089900 2009.07.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
**Маус Иоахим, Петцольд Урзула, Сцелений
Истфан (DE)**

(74) Представитель:
Попеленский Н.К. (RU)

(56) **SIDKY Y. A. ET AL.: "INHIBITION OF
MURINE TUMOR GROWTH BY AN INTERFERON-
INDUCING IMIDAZOQUINOLINAMINE", CANCER
RESEARCH, vol. 52, no. 13, 1992, pages 3528-
3533, XP002519208, ISSN: 0008-5472, abstract**

**PHILLIP R. FLESHNER ET AL.: "Practice
Parameters for Anal Squamous Neoplasms", 21
November 2007 (2007-11-21), DISEASES OF THE
COLON & RECTUM, SPRINGER-VERLAG, NE,
PAGE(S) 2-9, XP019568130, ISSN: 1530-0358,
page 5, paragraph 2, page 6, paragraph 4**

**LIPKA E. ET AL.: "Evaluation of
imiquimod and analogues with respect to their oral
delivery potential", PROCEEDINGS OF THE
CONTROLLED RELEASE SOCIETY 1997 US, no.**

**24, 1997, pages 337-338, XP009113787, ISSN:
1022-0178, page 337, column 2, paragraph 3**

**CARRASCO DANIEL ET AL.:
"Treatment of anogenital warts with imiquimod
5% cream followed by surgical excision of
residual lesions," JOURNAL OF THE
AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY
OCT 2002, vol. 47, no. 4 Suppl, October 2002
(2002-10), pages S212-S216, XP002519594,
ISSN: 0190-9622, abstract**

**DIAKOMANOLIS EMMANUEL ET
AL.: "Treatment of high-grade vaginal
intraepithelial neoplasia with imiquimod cream,"
THE NEW ENGLAND JOURNAL OF
MEDICINE 1 AUG 2002, vol. 347, no. 5, 1
August 2002 (2002-08-01), page 374,
XP002519595, ISSN: 1533-4406, column 2,
paragraph 1**

**PFENNINGER JOHN L. ET AL.:
"Common anorectal conditions", OBSTETRICS
AND GYNECOLOGY, vol. 98, no. 6, December
2001 (2001-12), pages 1130-1139, XP002519596,
ISSN: 0029-7844, abstract**

RU-A-2006121646

RU-C2-2308456

RU-A-95119625

**ЛЮБЧЕНКО Л.Н. Клинико-генотипи-
ческие варианты семейного рака толстой
кишки, Практическая онкология, т. 6, № 2,
2005, с. 132-136**

(57) Изобретение относится к лечению заболеваний ободочной и прямой кишок, таких как полипы, предраковых стадий и предупреждению и вспомогательному лечению новообразований толстого кишечника путем местного применения иммуномодулирующих лекарственных препаратов семейства имидазохинолина, таких как имихимод (1-(2-метилпропил)-1Н-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин), ресихимод (4-амино α,α-диметил-2-этоксиметил-1Н-имидазо[4,5-с]хинолин-1-этанол), сотириимод (2-метил-1-(2-метилпропил)-1Н-имидазо[4,5-с][1,5]нафтиридин-4-амин).

018579**B1****B1****018579**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к лечению заболеваний ободочной и прямой кишок, таких как полипы, предраковых стадий и предупреждению и вспомогательному лечению новообразований толстого кишечника путем местного введения иммуномодулирующих лекарственных препаратов семейства имидазохинолина, таких как имихимод (1-(2-метилпропил)-1Н-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин), ресихимод (4-амино- α , α -диметил-2-этоксиметил-1Н-имидазо[4,5-с]хинолин-1-этанол), сотиримод (2-метил-1-(2-метилпропил)-1Н-имидазо[4,5-с][1,5]нафтиридин-4-амин).

Сведения о предшествующем уровне техники

Полипы толстого кишечника довольно распространены среди взрослых среднего возраста и пожилых людей и часто не имеют заметных симптомов. Приблизительно 50% людей в возрасте старше 60 лет имеют полипы в толстой кишке. Их потенциальная возможность стать раковыми делает важным серьезное отношение к ним. Хотя подавляющее большинство полипов являются доброкачественными (неканцерогенными), почти все случаи рака толстой кишки развиваются из доброкачественных полипов. Карциномы являются причиной более чем 80% заболеваний раком человека, причем кожа, легкое, толстая кишка, молочная железа, простата и матка представляют собой наиболее распространенные области.

Полипы толстой кишки значительно различаются по размеру, форме и числу. Два основных типа представляют собой гиперпластический и аденоматозный. Гиперпластические полипы наиболее распространены и, как правило, не становятся раковыми. Аденоматозные полипы с большей вероятностью становятся раковыми.

В общем, развитие опухоли проходит три различные фазы: стимуляция, активация и развитие. Подходы к предупреждению рака, среди прочих, включают усиление механизмов защиты хозяина от рака, химиопрофилактику и другие. Несмотря на усовершенствования в раннем выявлении и лечении рака общие показатели смертности не снижаются за последние 30 лет.

Существует ряд возможностей снизить риск ракового развития полипа. Одна из возможностей предупредить развитие полипов толстой кишки в рак представляет собой диеты с низким содержанием жира и высоким содержанием волокон. Некоторые витамины также защищают от рака толстой кишки, а именно витамины С и Е. Нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты, такие как аспирин, снижают уровень образования полипов, хотя нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты не рекомендованы как средства для предупреждения полипов толстой кишки.

Из трех фаз развития опухоли фаза активации состоит из экспансии мутантных клеток с формированием активно пролиферирующего многоклеточного предзлокачественного поражения. Данная фаза активации канцерогенеза может дать самые подходящие мишени для предупреждения рака. Новая и специальная форма предупреждения рака представляет собой так называемую химиопрофилактику. Химиопрофилактика, по определению, представляет собой использование факторов с целью замедления развития, обратного развития или ингибирования канцерогенеза, снижая таким образом риск развития инвазивного или клинически важного заболевания.

Если установлена опухоль, то можно использовать несколько типов стандартного лечения. Они включают хирургическое вмешательство, химиотерапию, радиационную терапию и биологическую терапию. Биологическая терапия представляет собой лечение, при котором используется иммунная система пациента для борьбы с раком. Собственные субстанции организма или лекарственные препараты используют для усиления или восстановления природной защиты организма против рака. Данный тип лечения рака представляет собой так называемую биотерапию или иммунотерапию.

Имидазохинолины: Имихимод представляет собой иммуномодулирующее соединение семейства имидазохинолина, которое проявляет как антивирусный, так и противоопухолевый эффекты (см. статьи Diebold SS et al. Innate antiviral responses by means of toll-like receptor (TLR)-7-mediated recognition of single-stranded RNA. (Врожденные антивирусные ответы посредством опосредованного toll-подобным рецептором (TLR)-7 распознавания одноцепочечной РНК) Science 204; 303: 1529-1531; Bامتson RS et al. Imiquimod induced regression of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma is associated with early infiltration by CD4 T cells and dendritic cells (Вызываемая имихимодом регрессия клинически диагностированной поверхностной карциномы базальных клеток связана с ранней инфильтрацией Т-клеток CD4 и дендритных клеток), Clin. Exp. Dermatol 2004; 29: 639- 643). Показано, что имихимод проявляет свои эффекты в основном посредством TLR-7 (см. статью Hemmi H. et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR 7 MyD88-dependent signaling pathway. (Маленькие антивирусные соединения активируют иммунные клетки посредством MyD88-зависимого пути передачи сигнала TLR 7), Nat. Immunol 2002; 3:196-200). Имихимод эффективно подавляет развитие старческого кератоза (АК) в инвазивный рак кожи, обычно в карциному сквамозных клеток (SCC). Хотя имихимод не проявляет какие-либо прямые противоопухолевые активности (см. Schon M et al. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod (Избирательная в отношении опухоли индукция апоптоза и низкомолекулярный модификатор иммунного ответа имихимод), J Natl. Cancer Inst., 2003, 95:1138-49), показано, что он имеет высокую эффективность в отношении ряда опухолей кожи и других опухолей. У мышей лечение пероральным введением имихимода в существенной степени подавляет развитие карциномы толстой кишки MC-26. Противоопухолевые эффекты имихимода значительно снижа-

ются антисывороткой к мышинному α -интерферону (ИФН), позволяя предположить, что противоопухолевый эффект опосредован в существенной степени индукцией ИФН (см. статью Sidky YA et al. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine (Подавление роста мышинной опухоли имидазохинолиномом, индуцирующим интерферон), Cancer Res 1992; 52: 3528-33).

Точный механизм действия имихимода и родственных соединений в отношении раковых клеток сложен и еще неизвестен.

Имеются доказательства того, что имихимод способен стимулировать апоптоз различных злокачественных клеток кожи (см. статью Inglefield JR, et al. Apoptotic responses in squamous carcinoma and epithelial cells to small-molecule toll-like receptor agonists evaluated with automated cytometry (Апоптотические реакции в клетках сквамозной карциномы и эпителия на маленькие молекулы агонистов toll-подобного рецептора, оцениваемые с помощью автоматизированной цитометрии), J. Biomol Screen 2006; 11: 575-85).

Иммунотерапия

Опосредованные клетками иммунные ответы представляют собой важный аспект взаимодействий опухоль-хозяин при новообразованиях толстой кишки. Развитие из предраковых (аденоматозных) полипов толстой кишки в злокачественные новообразования толстого кишечника зависит от сложного пути, включающего активности активированных Т-лимфоцитов. Инициация иммунного ответа происходит, когда либо клетки цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺, либо клетки Т-хелперов CD4⁺ распознают антиген из раковой клетки человека. Опосредованный клетками ответ в значительной степени инициируется и контролируется действием различных цитокинов, которые проявляют сильные эффекты на пролиферацию Т-клеток, межклеточную адгезию, апоптоз и иммунитет хозяина. Существование иммунного ответа на рак толстой кишки поддерживают исследования иммунологических препаратов на человеке и моделях трансплантируемого мышинного рака у животных. ИЛ-2 (интерлейкин-2), ИЛ-12, ИФН- λ (интерферон- λ), ФНО- α (фактор некроза опухолей- α) и родственный ФНО индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL) участвуют в усилении цитотоксического и апоптотического эффектов в ответ на аденому толстой кишки. Кроме того, факторы роста, цитокины и иммуносупрессивные факторы могут играть важную роль в росте и выживаемости предзлокачественной ткани толстого кишечника.

Показано, что имихимод эффективен при лечении старческого кератоза (АК), а также предраковой стадии. Имихимод эффективно очищает поражения АК и препятствует развитию SCC и других злокачественных опухолей кожи.

Неожиданно данные иммуномодулирующие имидазохинолиновые производные ингибируют трансформацию предраковых клеток желудочно-кишечного тракта в клетки злокачественных новообразований толстого кишечника.

Применение различных имидазохинолиновых производных может привести в результате к более эффективному и безопасному лечению вышеупомянутых заболеваний ободочной и прямой кишок.

Сущность изобретения

Местное применение имидазохинолинов в отношении других типов клеток, особенно в отношении эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта, является новым подходом. Неожиданно иммуномодулирующие лекарственные препараты, например имихимод, ресихимод и ситиримод также ингибируют апоптоз не только эпидермальных клеток (например, кератиноцитов), но также эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта, показывая, что они способны подавлять раковое развитие полипа толстой кишки.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу лечения полипов/полипоза толстого кишечника посредством применения имидазохинолинового производного.

В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу лечения предраковых изменений толстого кишечника, предпочтительно в слизистой оболочке, посредством применения имидазохинолинового производного.

В следующем предпочтительном воплощении настоящее изобретение обеспечивает способ лечения ранних раковых изменений толстого кишечника, предпочтительно в слизистой оболочке, посредством применения имидазохинолинового производного.

В одном из предпочтительных воплощений настоящее изобретение относится к способу профилактики карциномы толстого кишечника посредством применения имидазохинолинового производного.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики трансформации полипов/полипоза толстого кишечника в карциному толстого кишечника посредством применения имидазохинолинового производного.

В одном из предпочтительных воплощений настоящее изобретение относится к способу вспомогательного лечения полипов/полипоза толстого кишечника посредством применения имидазохинолинового производного.

В еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение обеспечивает способ вспомогательного лечения карциномы толстого кишечника посредством применения имидазохинолинового производного.

В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения пациент может являться ВИЧ-инфицированным или пациентом с ослабленным иммунитетом.

В другом воплощении настоящего изобретения имидазохинолиновое производное может быть выбрано из группы, включающей имихимод, ресихимод, сотиримод. Также имидазохинолиновое производное может применяться местно в форме раствора, крема или пены.

В одном из предпочтительных вариантов изобретения имидазохинолиновое производное можно вводить 1-7, предпочтительно 1-5 раз в неделю в течение нескольких недель.

Перечень фигур, чертежей и иных материалов

На чертеже изображены результаты количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, показывающие дозозависимый эффект имихимода на экспрессию p53 в клетках Caco-2.

Сведения, подтверждающие возможность осуществить изобретение

Воздействие имихимода на апоптотические изменения исследуют, используя эпителиальные клетки толстой кишки. Клеточную линию Caco-2 широко используют в анализах *in vitro* для предсказания скорости всасывания потенциальных лекарственных соединений через барьер клеток кишечного эпителия. Вследствие этого данную клеточную линию используют для исследования эффектов имихимода на экспрессию p53. p53 представляет собой фактор транскрипции, который регулирует клеточный цикл и, следовательно, функции, в качестве супрессора опухоли. Данный ген супрессора опухоли является очень важным элементом в многостадийном развитии от доброкачественной гиперпролиферации до злокачественного заболевания.

Супрессор опухоли p53, по-видимому, является основным в плане предупреждения роста и выживаемости поврежденных и патологических клеток. Белок p53 является супрессором опухоли, кодируемым геном, нарушение которого ассоциировано с приблизительно 50-55% заболеваний раком у человека. Белок p53 действует как контрольная точка в клеточном цикле, либо препятствуя, либо иницируя запрограммированную гибель клетки. Другими словами, p53 представляет собой встроенный супрессор опухоли. Молекулу p53 можно инактивировать несколькими путями: i) в некоторых семьях мутации p53 являются наследственными; ii) вирусы опухолевой ДНК, такие как человеческий аденовирус и вирус папилломы человека, могут связывать и инактивировать функцию белка p53, изменяя клетки и иницируя рост опухоли. Имеются различия в экспрессии p53 в различных тканях. Аналогично регуляция гена p53 различна в различных человеческих моноцитах и лимфоцитах. Следовательно, изменения в коже отличаются от изменений, наблюдаемых в других тканях.

Способы

Имихимод растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО). Исходная концентрация составляет 10 мг/мл. Из данных исходных растворов готовят последовательные разведения. Конечные концентрации, используемые для всех соединений, лежат в интервале от 0,1 до 100 мкг/мл. Конечная концентрация ДМСО составляет 0,1%.

Клеточную линию аденокарциномы толстого кишечника Caco-2 получают из ATCC (Американская коллекция типовых культур), Wesel, Germany. Клетки помещают в 24-луночные планшеты (BD Bioscience, Heidelberg, Germany). Клетки культивируют в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% инактивированной нагреванием сыворотки телячьих эмбрионов и 10% незаменимых аминокислот в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37°C. При достижении конfluence клетки промывают и ресуспендируют в бессывороточной DMEM при концентрации 10⁶ клеток мл⁻¹. Клетки (1 × 10⁶ клеток/мл) инкубируют с различными концентрациями тест-субстанций.

РНК получают из замороженных лизатов, используя набор RNeasy, Qiagen (Hilden, Germany). Полимеразную цепную реакцию с участием обратной транскриптазы (ОТ-ПЦР) в одной пробирке проводят с использованием набора зондов для ОТ-ПЦР для количественного определения (Quantitect Probe RT-PCR Kit) фирмы QIAGEN (Hilden, Germany). Экспрессию p53 определяют относительно β-актина посредством ОТ-ПЦР в режиме реального времени при использовании анализов SYBR Green на приборе ABI Prism 7900. Наборы для анализов приобретают в фирме QIAGEN, Hilden, Germany (p53:QT00060235). Количество мРНК рассчитывают, используя способ ΔΔC_t. Для каждой ОТ-ПЦР устанавливают пороговый цикл (C_T), определяемый как цикл, на котором уровень флуоресценции в 10 раз превышает стандартное отклонение от средней исходной эмиссии для циклов 3-10. β-актин используют в качестве "гена домашнего хозяйства" для нормализации уровней мРНК: C_t (Параметр) - C_t(β-актин) = ΔC_t(Параметр). Данное значение устанавливают относительно контроля с носителем, который представляет собой уровни мРНК необработанных стимулированных клеток: ΔC_t (Параметр стимулированный) - ΔC_t (Параметр носитель) = ΔΔC_t (Параметр). Затем относительный уровень мРНК для соединения X рассчитывают как 2^{-ΔΔC_t} · 100%, основываясь на результатах контрольных экспериментов с эффективностью реакции ПЦР приблизительно 100% (согласно PE Applied Biosystems User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1997). Статистический анализ проводят с использованием программы GraphPad Prism Version 5 и односторонний тест ANOVA с последующим апостериорным анализом по Даннету.

Дозозависимый эффект имихимода на экспрессию p53 в клетках Caco-2 оценивают с помощью количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени (см. чертеж).

Имихимод в концентрациях до 100 мкМ повышает экспрессию мРНК гена p53 дозозависимым образом. При концентрациях имихимода 10 и 100 мкМ повышение уровней мРНК p53 достигает статистической достоверности.

По сравнению с p16^{INK4a} имихимод не влияет в равной мере на p53. У больных старческим кератозом не обнаружено никаких различий в экспрессии гена p53 при лечении имихимодом.

Следовательно, нельзя было бы ожидать того, что имидазохинолиновые производные, такие как имихимод, могут повышать экспрессию супрессора опухоли p53 в клетках желудочно-кишечного тракта, показывая положительный эффект при лечении предраковых/раковых состояний.

Данные факты показывают, что имихимод оказывает положительное воздействие на уровень экспрессии гена супрессора опухоли в клетках желудочно-кишечного тракта. Данный эффект имихимода, возможно, важен для лечения полипоза толстого кишечника/полипов толстой кишки, предупреждения карциномы толстого кишечника и вспомогательного лечения новообразований толстого кишечника совместно с принятым лечением, например, хирургическим вмешательством.

Примеры

Лечение, предусматриваемое данным изобретением, включает введение имихимода или других имидазохинолиновых производных, таких как ресихимод, сотиримод, с целью лечения имеющегося патологического состояния, полипов толстой кишки/полипоза, для того, чтобы уменьшить вероятность раковой трансформации, замедлить развитие заболевания.

Соединения можно вводить местно (ректально или непосредственно на ткань во время хирургического вмешательства) в форме раствора, крема, клизмы или пены. Соединения можно использовать профилактически или после появления симптомов или дополнительно к принятому лечению, такому как хирургическое вмешательство, или дополнительно к удалению полипа толстого кишечника во время колоноскопии.

Препараты, содержащие активный лекарственный препарат, предназначены для применения 1-7 раз, предпочтительно 1-5 раз в неделю в течение нескольких недель.

Предпочтительная доза составляет от 1 до 1000 мг имихимода, более предпочтительно 10-100 мг 3 раза в неделю в течение 16 недель.

Общее количество имихимода может составлять по меньшей мере 0,1 мас.% и не больше чем 9 мас.%. В ряде вариантов осуществления общее количество имихимода может составлять по меньшей мере 0,5 мас.% и не больше чем 9 мас.%, основываясь на общей массе композиции (пока не указано иначе, все проценты, приведенные в данном контексте, представляют собой мас./мас. относительно общей массы композиции), хотя в некоторых вариантах осуществления композиция может содержать количество имихимода, выходящее за рамки данного интервала. Например, композиция может включать имихимод в концентрации 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 мас.%. Общее количество сотиримода или ресихимода может составлять по меньшей мере 0,001 мас.% и не больше чем 9 мас.%. В ряде вариантов осуществления общее количество сотиримода или ресихимода может составлять по меньшей мере 0,1 мас.% и не больше чем 9 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 0,5 мас.% и не больше чем 9 мас.%, основываясь на общей массе композиции (пока не указано иначе, все проценты, приведенные в данном контексте, представляют собой мас./мас. относительно общей массы композиции), хотя в некоторых вариантах осуществления композиция может содержать количество сотиримода или ресихимода, выходящее за рамки данного интервала. Например, композиция может включать сотиримод или ресихимод в концентрации 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 мас.%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения полипов/полипоза толстого кишечника посредством применения имихимода.
2. Способ лечения предраковых изменений толстого кишечника, предпочтительно в слизистой оболочке, посредством применения имихимода.
3. Способ лечения ранних раковых изменений толстого кишечника, предпочтительно в слизистой оболочке, посредством применения имихимода.
4. Способ профилактики трансформации полипов/полипоза толстого кишечника в карциному толстого кишечника посредством применения имихимода.
5. Способ вспомогательного лечения полипов/полипоза толстого кишечника посредством применения имихимода.
6. Способ по любому из пп.1-5, в котором пациент является ВИЧ-инфицированным или пациентом с ослабленным иммунитетом.
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором имихимод вводят местно в форме раствора, крема или пены.
8. Способ по любому из пп.1-6, в котором имихимод вводят от 1 до 7, предпочтительно от 1 до 5 раз в неделю в течение нескольких недель.

