



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97249** (13) **C2**

(51) **МПК** (2011.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00
A61K 38/05 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМБІНАЦІЯ ІНГІБІТОРА ГІСТОНОВИХ ДЕЗАЦЕТИЛАЗ З ПОЄДНАНОЮ АКТИВНІСТЮ ВІДНОСНО ГІСТОНОВИХ ДЕЗАЦЕТИЛАЗ КЛАСУ I І КЛАСУ II В З ІНГІБІТОРОМ ПРОТЕАСОМ БОРТЕЗОМІБОМ ДЛЯ ПРИГНІЧЕННЯ РОСТУ ПУХЛИННИХ КЛІТИН

1

2

(21) a200900388
(22) 11.09.2007
(24) 25.01.2012
(86) PCT/EP2007/059518, 11.09.2007
(31) 06120726.2
(32) 15.09.2006
(33) EP
(31) 60/915,895
(32) 03.05.2007
(33) US
(46) 25.01.2012, Бюл.№ 2, 2012 р.
(72) АРТС ЖАНІН, NL, ХЕЛЛЕМАНС ПЕТЕР ВІЛЛЕМ ЯН, BE, ЖАНІКО МІШЕЛЬ МАРІ ФРАНСУА, FR/BE, ПЕЙДЖ МАРТІН ДЖОН, GB/BE
(73) ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ, BE
(56) WO 2006/010750 A, 02.02.2006
HIDESHIMA T ET AL: "Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 102, no. 24, 14 June 2005 (2005-06-14), pages 8567-8572
LENTZSCH SUZANNE ET AL: "Combination of proteasome inhibitor PS 341 (Veleade (R)) with histone acetylase inhibitor (HDAC) PXD 101 shows superior anti-myeloma activity and inhibits osteoclastogenesis" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, vol. 106, no. 11, pt. 1, 1 November 2005 (2005-11-01), page Abstr.2488
MITSIADES C S ET AL: "Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: Biological and clinical implications" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 101, no. 2, 13 January 2004 (2004-01-13), pages 540-545
PEI XIN-YAN ET AL: "Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN

ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 10, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 3839-3852
SUTHEESOPHON KRITTAYA ET AL: "Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib" ACTA HAEMATOLOGICA, S. KARGER, BASEL, CH, vol. 115, no. 1-2, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 78-90
TERZAH M HORTON ET AL: "Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro" CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 58, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 13-23
CATLEY LAURENCE ET AL: "Novel hydroxamic acid-derived HDAC inhibitor LBH589 potently activates intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and induces tubulin hyperacetylation in multiple myeloma" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, vol. 106, no. 11, Part 1, 1 November 2005 (2005-11-01), page 453A
YU CHUNRONG ET AL: "The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to ST1571" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, vol. 102, no. 10, 15 November 2003 (2003-11-15), pages 3765-3774
BAI ET AL: "Histone deacetylase inhibitor trichostatin A and proteasome inhibitor PS-341 synergistically induce apoptosis in pancreatic cancer cells" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 348, no. 4, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 1245-1253
PEI XINYAN ET AL: "The proteasome inhibitor Bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in human multiple myeloma cells" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 685a

(13) **C2**

(11) **97249**

(19) **UA**

GIMSING PETER ET AL: "Activity of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor PXD101 in preclinical studies and in a phase I study in patients with advanced haematological tumors." BLOOD, vol. 106, no. 11, Part 1, November 2005 (2005-11), pages 932A-933A

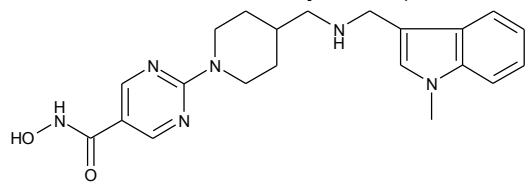
BASU SUPRATIK ET AL: "The histone deacetylase inhibitor sodium valproate has in vitro anti-neoplastic activity against primary multiple myeloma cells and cell lines both alone and in combination with Velcade." BLOOD, vol. 106, no. 11, Part 2, November 2005 (2005-11), page 370B

HIDESHIMA TERU ET AL: "Small molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic anti-tumor activity in multiple myeloma" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, vol. 106, no. 11, pt. 1, 1 November 2005 (2005-11-01), page Abstr.1570

WIRTZ UWE F ET AL: "Pivanex, a histone deacetylase inhibitor, is synergistic with Velcade in inhibiting growth of human non-small cell lung cancer cells." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 46, April 2005 (2005-04), pages 1448-1449

ADACHI M ET AL: "Synergistic effect of histone deacetylase inhibitors FK228 and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide with proteasome inhibitors PSI and PS-341 against gastrointestinal adenocarcinoma cells" CLINICAL CANCER RESEARCH 20040601 US, vol. 10, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 3853-3862

(57) 1. Комбінація інгібітора, де вказаним інгібітором протеасоми є бортезоміб, та інгібітора гістонової дезацетилази є сполукою 1a (JNJ 26481585)



, 1a

його фармацевтично прийнятною кислотно- або основноадитивною сіллю та стереохімічно ізомерною формою.

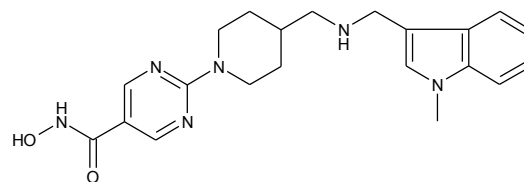
2. Комбінація за п. 1 у формі фармацевтичної композиції, що містить бортезоміб і сполуку 1a разом з одним або декількома фармацевтичними носіями.

3. Комбінація за п. 2 для одночасного, роздільного або послідовного застосування.

4. Комбінація за будь-яким з пп. 1-3 для застосування в медикаментозному лікуванні.

5. Застосування комбінації за п. 1 або 2 для виробництва лікарського засобу для інгібування росту пухлинних клітин.

6. Застосування інгібітора гістонової дезацетилази в комбінації з інгібітором протеасоми, для виробництва лікарського засобу для лікування гострого лімфобластозного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, гострого промієлоцитарного лейкозу, гострого мієлоїдного лейкозу, гострого моноцитарного лейкозу, лімфоми, хронічного В-клітинного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу у фазі бластозного кризу, лімфоми Беркітта і множинної мієломи, де вказаним інгібітором гістонової дезацетилази є сполука 1a



, 1a

її фармацевтично прийнятні кислотно- або основноадитивні солі і стереохімічно ізомерні форми, і де вказаним інгібітором протеасоми є бортезоміб.

7. Застосування за п. 6, яке **відрізняється** тим, що вказаний лікарський засіб використовують для лікування резистентного до ліків гострого лімфобластозного лейкозу, резистентного до ліків гострого мієлогенного лейкозу, резистентного до ліків гострого промієлоцитарного лейкозу, резистентного до ліків гострого мієлоїдного лейкозу, резистентного до ліків гострого моноцитарного лейкозу, резистентної до ліків лімфоми, резистентного до ліків хронічного В-клітинного лейкозу, резистентного до ліків хронічного мієлоїдного лейкозу, резистентного до ліків хронічного мієлоїдного лейкозу у фазі бластозного кризу, резистентної до ліків лімфоми Беркітта і резистентної до ліків множинної мієломи.

8. Застосування за п. 6 або 7, яке **відрізняється** тим, що вказаний лікарський засіб використовують для лікування множинної мієломи, стійкої до бортезомібу.

Даний винахід відноситься до інгібіторів гістонових дезацетилаз (HDAC) з поєднаною активністю відносно гістонових дезацетилаз класу I і класу II. Він відноситься до комбінацій і композицій, що їх містять, а також до їх застосування у якості лікарського засобу, наприклад, у якості лікарського засобу для інгібування гематопоетичних пухлин, таких як лімфоми і лейкози.

Сімейство ферментів HDAC було назване після ідентифікації їх першого субстрата, тобто ядерних білків-гістонових. Білки-гістони (H2A, H2B, H3 і H4) утворюють октамірний комплекс, довкола якого згортається спіраль ДНК, щоб створити структуру конденсованого хроматину. Ацетильований

стан гістонів знаходиться в динамічній рівновазі, обумовлений гістоновими ацетилтрансферазами (HAT), які ацетилюють, і HDAC, які відповідають за дезацетилювання гістонових хвостів. Інгібування ферменту HDAC підсилює ацетилювання гістонових хвостів нуклеосоми, сприяючи створенню більш транскрипційно компетентної структури хроматину, яка, у свою чергу, призводить до зміненої експресії генів, залучених в клітинні процеси, такі як клітинна проліферація, апоптоз і диференціювання. За останні роки було ідентифіковано все зростаюче число додаткових, відмінних від гістонових, субстратів для HDAC.

При специфічних формах лейкозу і лімфоми, таких як гострий промієлоцитарний лейкоз (APL), неходжкінська лімфома і гострий мієлоїдний лейкоз (AML), виявляють постійне рекрутування HDAC з порушеною регуляцією в хроматині у поєднанні з онкогенними факторами транскрипції. У клітинах раку простати було виявлене підвищення HDAC1 на рівні білків по мірі прогресування захворювання, починаючи від злоякісних патологічних змін і високо диференційованої андроген-залежної аденокарциноми простати у напрямку до фенотипично дедиференційованому андроген-нечутливому раку простати. Крім того, у більшості експлантатів колоректального раку людини, який викликається втратою пухлинного супресора аденоматозного поліпозу товстого кишечника (APC), виявляють підвищену експресію HDAC2.

Відповідно до рівноваги активностей HDAC/HAT при раку було показано, що інгібітори HDAC індують зупинку клітинного циклу, термінальне диференціювання і апоптоз у широкому спектрі ліній клітин пухлин людини *in vitro*, інгібують ангиогенез і проявляють *in vivo* протипухлинну активність на моделях ксенотрансплантатів людини у «голих мишей».

Сімейство ферментів HDAC зазвичай підрозділяють на 3 класи: тобто класи I, II і III. В основному передбачали, що лише класи I і II опосередковують ефекти інгібіторів HDAC, що знаходяться в клінічній розробці.

Було показано, що група HDAC класу I, яка складається з членів сімейства HDAC 1-3 і 8, є відповідальною за проліферацію пухлинних клітин.

Серед великого числа факторів транскрипції, які для придушення специфічних промоторів використовують HDAC класу I, найбільш відомим прикладом є клас ядерних рецепторів гормонів, які у відсутність свого ліганда зв'язуються лише з HDAC3 і, таким чином, підтримують стан сайленсинга транскрипції. Комплекс дисоціює ліганд-залежним способом, наприклад, за допомогою ретиноїдів, естрогену, андрогенів і так далі, приводячи до експресії гена і диференціювання. Іншим важливим прикладом є HDAC 1-залежний сайленсинг інгібітору циклін-залежної кінрази $p21^{waf1, cip1}$. Важлива роль індукції $p21^{waf1, cip1}$ в антипроліферативних ефектах інгібіторів HDAC була продемонстрована шляхом дослідження, що показує 6-кратне підвищення стійкості до інгібітору HDAC трихостатину A (TSA) в клітинах, дефіцитних по $p21^{waf1, cip1}$, у порівнянні з вихідними клітинами HCT-116. Крім того, на відміну від дійсних генів пухлинної супресії, $p21^{waf1, cip1}$ всюди присутній у пухлинних клітинах і індукується інгібіторами HDAC.

Субстратами HDAC класу I є не лише гістони. Наприклад, HDAC 1-3 деацетилює пухлинний супресор p53, який в результаті стає убівітинованим і деградує. Оскільки p53 є потенційним пухлинним супресором, що включає зупинку клітинного циклу і апоптоз, підтримка низьких рівнів цього білка важлива для життєздатності і неконтрольованої проліферації пухлинних клітин.

HDAC класу II можуть бути розділені на 2 підкласи: клас IIa, що містить HDAC 4, 5, 7, 9 і MTR,

сплайсирований варіант гістонової деацетилази HDAC 9. Клас IIb містить HDAC6 і HDAC10, які мають домени HDAC, що повторюються. HDAC класу IIa не мають дійсної активності гістонових деацетилаз, але регулюють експресію генів, функціонуючи у якості еднальних факторів, оскільки вони асоціюють як з комплексами HDAC класу I, так і з комплексами фактор транскрипції/ДНК.

Увагу привернув HDAC6, член класу IIb, унаслідок його ідентифікації як деацетилази Hsp90. Було показано, що інгібітори HDAC LAQ824 і LBH589 індують деацетилювання Hsp90, тоді як трапексин і бутират натрію не індують. Деацетилювання Hsp90 приводить до деградації Hsp90-асоційованих білків-«клієнтів», що сприяють виживанню і проліферації.

Основні приклади включають Her-2, Bcr-Ab1, глюкокортикоїдний рецептор, мутантний FLT-3, c-Raf і Akt. Окрім Hsp90, HDAC6 також опосередковує деацетилювання тубуліну, яке приводить до де-стабілізації мікротрубочок в умовах стресу.

Біологічна роль HDAC6 була додатково підтверджена тим фактом, що специфічний низькомолекулярний інгібітор HDAC6, тубацин, викликає гіперацетилювання α -тубуліна і знижує рухливість клітин, не впливаючи на проходження клітинного циклу. Тубацин, який інгібуює лише домен деацетилази α -тубуліна гістонової деацетилази HDAC6, викликає лише незначне підвищення ацетилювання HSP90.

Відповідно, було виявлено, що HDAC6 важливий для естрадіол-стимульованої клітинної міграції клітин карциноми молочної залози MCF-7.

На закінчення, HDAC6 відіграє важливу роль в контролі клітиною неправильно згорнутих білків і видаленні їх із цитоплазми.

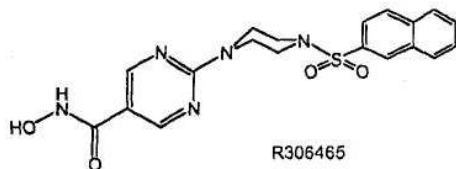
Унаслідок великої кількості білків-регуляторів клітинного циклу, регульованих за допомогою HDAC відносно рівня або їх експресії, або активності, антипроліферативний ефект інгібіторів HDAC не може бути пов'язаний з одиничним механізмом дії. Інгібування HDAC має певну перспективу в протираковій терапії, де спільний вплив на велику кількість шляхів, залучених в інгібування зростання, диференціювання і апоптоз, може мати переваги при лікуванні гетерогенної патології, такий як онкогенез і пухлинне зростання.

Останніми роками стало зрозуміло, що HDAC відіграють важливу роль не лише в канцерогенезі, але й у великому числі незлоякісних процесів диференціювання. Це найочевидніше для класу IIa 4, 5, 7 і 9. Наприклад, було висловлено припущення, що HDAC7 відіграє основну роль у дозріванні Т-клітин в тимусі, тоді як HDAC4 залучений у регуляцію гіпертрофії хондроцитів і ендохондрального окостеніння. Найбільша увага, проте, була зосереджена довкола ролі HDAC класу IIa в диференціюванні м'язової тканини. HDAC 4, 5, 7 і 9 супресують диференціювання міоцитів (м'язових клітин) в результаті наявності ко-репресорів транскрипції міоцит-специфічного енхансера 2 (MEF2).

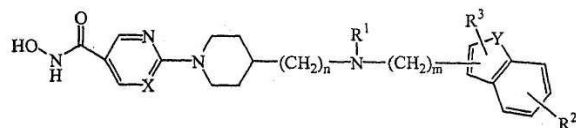
Найбільш частою токсичністю, що спостерігається при використанні інгібіторів HDAC, є мієлосупресія від легкого до помірного ступеню. Крім того, в багатьох клінічних випробуваннях у якості

негативних ефектів спостерігаються нудота/блювота, стомлюваність і діарея.

У патенті EP 1485365, опублікованому 18 вересня 2003, описується, серед інших, інгібітор HDAC R3 06465.



У публікації WO 2006/010750 від 2 лютого 2006 описується отримання, склад і фармацевтичні властивості сполук наступної формули Маркуша



їх N-оксидних форм, фармацевтично прийнятних адитивних солей і стереохімічно ізомерних форм,

де n, m, R¹, R², R³, X і Y мають значення, визначені у вказаному описі.

Можливість лікування інгібітором HDAC, проте, виходить за межі використання окремого агента. Молекулярні шляхи, на які впливають інгібітори HDAC, роблять його перспективним кандидатом для комбінаторних досліджень.

Існує потреба в інгібіторах з комбінованими діями відносно HDAC класу I і класу IIb, які можуть забезпечити клінічні переваги, враховуючи ефективність та/або токсичність, або самостійно, або в поєднаннях з іншими терапевтичними агентами.

Крім того, важливою, нещодавно розробленою стратегією при лікуванні раку є інгібування протеасоми. Протеасома є мультиферментним комплексом, що присутній у всіх клітинах, який бере участь у деградації білків, залучених у регуляцію клітинного циклу. Велика кількість важливих регуляторних білків, включаючи p53, цикліни і циклін-залежну кіназу p21^{waf1/cip1}, з часом деградують в ході клітинного циклу за допомогою убіквітин-протеасомного шляху. Впорядкована деградація цих білків потрібна клітині для проходження клітинного циклу і для здійснення митоза. Більш того, убіквітин-протеасомний шлях необхідний для регуляції транскрипції.

У патентах EP788360, EP1312609, EP1627880, US6066730 і US6083903 описуються складноєфірні і кислотні сполуки боронової кислоти і пептиду, що використовуються як інгібітори протеасом. Одна із сполук, N-піразинкарбоніл-L-фенілаланін-L-лейцинборонова кислота (PS-341, у даний час відома як бортезоміб або Velcade (продукція фірми Millenium)), має протипухлинну активність на моделях ксенотрансплантатів пухлин людини і отримала дозвіл на лікування пацієнтів з рецидивуючою рефрактерною множинною мієломою, і в даний час проходить клінічні випробування в додаткових показаннях, що включають інший рак крові, а також солідні пухлини. Бортезоміб індукує смерть клітини, викликаючи накопичення неправильно скручених і інакше пошкоджених білків, таким

чином, активуючи мітохондріальний шлях апоптозу, наприклад, через Вах-залежні або залежні від активних форм кисню механізми.

Бортезоміб викликає секвестрацію кон'югованих з убіквітином білків у структурах, що називаються агросомами. Агросоми представляються такими, що беруть участь у цитопротекторній відповіді, яка активується у відповідь на інгібування протеасоми, можливо, за допомогою перенесення убіквітильованих білків до лізосом для деградації.

Бортезоміб-індуковане утворення агросоми може бути перерване використанням інгібітору HDAC SAHA (субероїланілдігидроксамової кислоти). SAHA також демонструє синергетичні ефекти відносно апоптозу *in vitro* і на моделі ортотопічного ксенотрансплантату раку підшлункової залози *in vivo* (Cancer Research 2006; 66: (7) 3773-3781).

Інший інгібітор HDAC LAQ824 при введенні разом з бортезомібом також демонструє синергетичні рівні клітинної загибелі (Journal of Biological Chemistry 2005; 280: (29) 26729-26734).

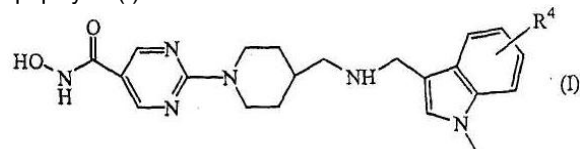
Синергетичний ефект SAHA і LAQ824 при введенні разом з бортезомібом був пов'язаний з їх активністю інгібування HDAC6.

Існує додаткова необхідність у підвищенні ефективності інгібування інгібіторів протеасоми відносно пухлинного зростання, а також у зниженні доз таких агентів для зменшення вірогідності негативних токсичних побічних ефектів для пацієнта.

На даний час немає прямих даних по взаємозв'язку між ступенем ацетилювання і відповіддю пухлини. Швидкі, прості і нескладні у виконанні відтворені способи розрахунку міри ацетилювання гістонових і відмінних від гістонових субстратів, обумовлені описаними нижче інгібіторами HDAC або комбінаціями, що містять вказані інгібітори HDAC, будуть вирішальними для перспективи їх використання.

Завданням винаходу є надання інгібіторів HDAC і терапевтичних комбінацій інгібітору протеасоми і інгібіторів HDAC типу, описаного нижче, які можуть володіти стійкими і типовими ефектами ацетилювання, інгібування HDAC як класу I, так і класу IIb, переважним ефектом інгібування зростання пухлинних клітин і зменшеними небажаними побічними ефектами.

Тому, згідно винаходу, автори пропонують комбінацію інгібітору протеасоми і інгібітору HDAC формули (I)



його фармацевтично прийнятної кисло- або основно-адитивної солі і стехіометрично ізомерних форм, де

R⁴ вибраний з водню або галогену.

Сполуками, що цікавлять, є такі сполуки формули (I), в яких R⁴ є фтором.

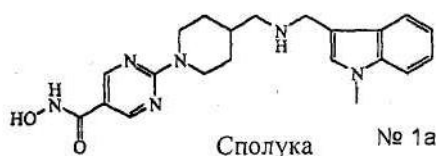
Сполуками, що більш цікавлять, є такі сполуки формули (I), в яких R⁴ знаходиться в положенні 4 або 7 індолю.

Бажаними сполуками формули (I) є сполука № 1a, сполука № 30 і сполука № 39 відповідно до

нумерації, вказаної в публікації WO 2006/010750.

	$C_2HF_3O_2$; сполука 1a
	$C_2HF_3O_2$ (1:1); сполука 30
	$C_2HF_3O_2$ (1:1) сполука 39

Іншими бажаними сполуками формули (I) є сполуки, в яких R^4 є воднем. Найбажанішою сполукою є сполука № 1a



або її фармацевтично прийнятна адитивна сіль.

Лінії, проведені в біциклічні кільцеві системи від замісників, вказують на те, що зв'язки можуть бути приєднані до будь-якого з відповідних кільцевих атомів біциклічної кільцевої системи.

Як використовується у вищезазначених визначеннях і далі в даному документі, галоген відноситься до фтору, хлору, броду і йоду.

Як використовується в даному документі, під термінами «гістонова деацетилаза» і «HDAC» розуміють будь-яке сімейство ферментів, які видаляють ацетильні групи з ϵ -аміногруп лізинових залишків на N-конці гістону. Якщо контекстом не вказане інше, під терміном «гістон» розуміють будь-який білок-гістон, включаючи H1, H2A, H2B, H3, H4 і H5, від будь-якого виду. Білки або генні продукти HDAC людини включають, без обмеження перерахованим, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9, HDAC-10 і HDAC-11. Гістонова деацетилаза також може бути отримана з простіших або грибів.

Термін «інгібітор гістонової деацетилази» або «інгібітор деацетилази гістону» використовують для ідентифікації сполуки, яка здатна взаємодіяти з гістоновою деацетилазою і інгібувати її активність, конкретніше, її ферментативну активність. Під інгібуванням ферментативної активності гістонової деацетилази розуміють зниження здатності гістонової деацетилази видаляти ацетильну групу з гістону або іншого білкового субстрата. Бажано, таке інгібування є специфічним, тобто інгібітор гістонової деацетилази знижує здатність гістонової деацетилази видаляти ацетильну групу з гістону або іншого білкового субстрату в концентрації, яка нижче, ніж концентрація інгібітору, необхідна для отримання іншого, не пов'язаного з цим, біологічного ефекту.

Термін «інгібітори HDAC з поєднаною активністю відносно HDAC класу I і класу IIb» або «інгібування HDAC класу I і класу IIb» використовують для ідентифікації сполук, які знижують ферментативну активність як члена сімейства HDAC класу I (HDAC 1-3 або 8), так і члена сімейства HDAC класу IIb (HDAC 6 або 10) в концентрації, яка нижче, ніж концентрація інгібітору, необхідна для інгібування інших класів ферментів HDAC, таких як, наприклад, клас IIa, або в концентрації, яка нижче, ніж концентрація інгібітору, необхідна для інгібування іншого, не пов'язаного з цим, біологічного ефекту.

Як використовується в даному документі, під термінами «протеасома» і «убіквітин-протеасома система (UPS)» розуміють будь-яку структуру і функцію всіх компонентів в UPS, які включають, без обмеження перерахованим:

a) убіквітин (Ub) і убіквітин-подібні білки (U1p); наприклад, SUMO, NEDD8, ISG15 і подібні,

b) мономери убіквітина, K48-зв'язані поліубіквітинові ланцюги, K63-зв'язані поліубіквітинові ланцюги і подібні,

c) убіквітин-активуючі ферменти E1; наприклад, E1^{Ub}, E1^{SUMO}, E1^{NEDD8}, E1^{ISG15} і подібні,

d) субодиниці убіквітин-активуючих ферментів E1; наприклад, APPBP1, UBA3, SAE1, SAE2 і подібні,

e) убіквітин-кон'югуючі ферменти E2; наприклад, UBC9, UBC12, UBC8 і подібні,

f) убіквітин-лігази E3; наприклад, RING-finger E3, одиночні RING-finger E3, RING-finger E3 сімейства куллінів, RBX1-/RBX2-залежні E3, HECT-доменові E3, U-box E3 і подібні,

g) комплекс E3 убіквітин-лігази SCF (SKP1-куллін1-F-box), наприклад, SCF^{SKP2}, SCF^{B-TRCP}, SCF^{FBW7} і подібні;

h) білки сімейства куллінів, наприклад, CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5 і подібні,

i) білки сімейства F-box, наприклад, SKP2, білки B-TRCP, білки FBW і подібні,

j) інші субстрат-специфічні адаптори, наприклад, білки BTB, білки SOCS-box, DDB1/2, VHL і подібні,

k) протеасому, її компоненти і тому подібне,

l) металоізопептидазу RPN11, субодиницю кришки протеасоми, яка видаляє убіквітин з мішеней UPS перед їх деструкцією, і подібні,

m) металоізопептидазу CSN5, субодиницю COP9-сигнального комплексу, яка відповідає за видалення NEDD8 з білків сімейства куллінів, і подібні,

n) стадію активації за допомогою убіквітин-активуючого ферменту E1, на якій Ub/U1p спочатку стає аденільованим на своєму C-кінцевому гліциновому залишку, а потім стає зарядженим у вигляді складного тіолового ефіру, знову-таки на своєму C-кінці,

o) перенесення Ub/U1p з убіквітин-активуючого ферменту E1 на убіквітин-кон'югуючий фермент,

p) розпізнавання убіквітин-кон'югата,

q) перенесення і зв'язування субстрат-убіквітинового комплексу з протеасомою,

г) видалення убіквітина, або

с) деградацію субстрата.

Термін «інгібітор протеасоми» і «інгібітор убіквітин-протеасомної системи» використовують для ідентифікації сполуки, яка здатна взаємодіяти з яким-небудь нормальним, зміненим, гіперактивним або надекспресуючим компонентом в UPS і інгібувати її активність, конкретніше, її ферментативну активність. Під інгібуванням ферментативної активності UPS розуміють зниження здатності компонента UPS здійснювати свою активність. Бажано, таке інгібування є специфічним, тобто інгібітор протеасоми знижує активність компонента UPS в концентрації, яка нижче, ніж концентрація інгібітору, необхідна для отримання іншого, не пов'язаного з цим, біологічного ефекту. Інгібітори активності компонента UPS включають, без обмеження перерахованим:

a) інгібітори аденільовання Ub або U1p, що блокують доступ Ub/UPS до сайту аденільовання або такі, що блокують доступ АТФ; наприклад, імаїніб (Gleevec; Novartis) і подібні,

b) дезінтергатори взаємодії E3 або E3-комплекса з E2,

c) відокремлювачі взаємодії між субстратом і доменом E3 або E3-комплекса, що взаємодіє з субстратом, такі як блокуючі взаємодію між p53 (субстрат) і MDM2 (RING-finger E3), наприклад, білки сімейства натлінів (що зв'язуються з MDM2), RITA (що зв'язуються з N-кінцем p53) і подібні,

d) відокремлювачі лігазного комплексу E3,

e) фактори, штучно рекрутуючі субстрати для убіквітин-лігаз, наприклад, білки сімейства протак і подібні,

f) інгібітори протеасоми і її компонентів, наприклад, бортезоміб, карфілзоміб, NPI-0052, Bsc2128 і подібні,

g) інгібітори видалення убіквітина/U1p, такі як інгібітори металоізопептидаз RPN11 і CSN5, або

h) модифікатори поліубіквітинового ланцюга, наприклад, убістатини і подібні. Під фармацевтично прийнятними кислотно-адитивними солями, згаданими в даному документі вище, розуміють вміст терапевтично активних нетоксичних кислотно-адитивних сольових форм, які здатні утворювати сполуки формули (I). Сполуки формули (I), які мають основні властивості, можуть бути перетворені в їх фармацевтично прийнятні кислотно-адитивні солі шляхом обробки вказаної основної

форми прийнятною кислотою. Прийнятні кислоти включають, наприклад, неорганічні кислоти, такі як галогеноводневі кислоти, наприклад, хлористоводнева або бромистоводнева кислота; сірчана; азотна; фосфорна і подібні кислоти; або органічні кислоти, такі як, наприклад, оцтова, трифтороцтова, пропанова, гідроксипропанова, молочна, піровиноградна, щавлева, малінова, янтарна (тобто бутандикислота), малеїнова, фумарова, яблучна, винна, лимонна, метансульфонова, етансульфонова, бензолсульфонова, п-толуолсульфонова, циклопропанова, саліцилова, п-аміносаліцилова, памова і подібні кислоти.

Сполуки формули (I), які мають кислотні властивості, можуть бути перетворені в їх фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі шляхом обробки вказаної кислотної форми відповідною органічною або неорганічною основою. Відповідні основні сольові форми включають, наприклад, солі амонію, солі лужних і лужноземельних металів, наприклад, солі літію, натрію, калію, магнію, кальцію і подібні, солі з органічними основами, наприклад, бензатин, N-метил-D-глюкамін, солі гідрабітаміна, і солі з амінокислотами, такими як, наприклад, аргінін, лізін і подібні.

Терміни кислотно- або основно-адитивна сіль також включають гідрати і адитивні форми з розфактором, які здатні утворювати сполуки формули (I). Прикладами таких форм є, наприклад, гідрати, алкоголяти і тому подібне.

Термін стереохімічно ізомерні форми сполук формули (I), що використовується в даному документі вище, визначає всі можливі сполуки, що складаються з тих же атомів, зв'язаних тією ж послідовністю зв'язків, але маючих різні тривимірні структури, не є взаємозамінними, якими можуть володіти сполуки формули (I). Якщо не згадується або не вказується інше, хімічна назва сполуки охоплює суміш усіх можливих стереохімічно ізомерних форм, які може мати вказана сполука. Вказана суміш може містити всі діастереомери і енантіомери основної молекулярної структури вказаної сполуки. Усі стереохімічно ізомерні форми сполук формули (I), як у чистому вигляді, так і в суміші один з одним, включені в обсяг даного винаходу.

Деякі сполуки формули (I) можуть також існувати в їх таутомерних формах. Хоча такі форми явно не вказані в наведеній вище формулі, вони мають бути включені в обсяг даного винаходу.

Термін «сполуки формули (I)», що використовується тут і далі у всьому описі, включає також фармацевтично прийнятні кислотно- або основно-адитивні солі і всі стереоізомерні форми.

Особливо бажаним інгібітором протеасоми, що використовується відповідно до винаходу, є бортезоміб. Бортезоміб комерційно доступний від фірми Millennium під торгівельним найменуванням Velcade і може бути отриманий, наприклад, як описано в патентах EP788360, EP1312609, EP1627880, US6066730 і US6083903 або способами, аналогічними цим.

Даний винахід також відноситься до комбінацій за винаходом для вживання в консервативній терапії, наприклад, для інгібування зростання пухлинних клітин.

Даний винахід також відноситься до вживання комбінацій за винаходом для отримання фармацевтичної композиції для інгібування зростання пухлинних клітин.

Даний винахід також відноситься до способу інгібування зростання пухлинних клітин в індивідумі, який включає введення індивідумові ефективної кількості комбінації за винаходом.

Даний винахід додатково відноситься до способу інгібування аномального зростання клітин, включаючи трансформовані клітини, шляхом введення ефективної кількості комбінації за винаходом. Аномальне зростання клітин відноситься до клітинного зростання, незалежного від нормальних механізмів регуляції (наприклад, втрата контактного інгібування). Цей спосіб включає інгібування зростання пухлини як безпосередньо, викликаючи зупинку зростання, термінальне диференціювання та/або апоптоз ракових клітин, так і побічно, шляхом інгібування міграції, інвазії і життєздатності пухлинних клітин або неоваскуляризації пухлин.

Даний винахід також відноситься до способу інгібування зростання пухлини шляхом введення ефективної кількості комбінації за даним винаходом індивідумові, наприклад, ссавцеві (а конкретніше, людині), що потребує такого лікування. Зокрема, даний винахід відноситься до способу інгібування зростання пухлин шляхом введення ефективної кількості комбінації за даним винаходом. Даний винахід особливо можна застосовувати для лікування раку підшлункової залози, гематопоетичних пухлин лімфоїдного ряду, наприклад, гострого лімфобластного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, гострого промієлоцитарного лейкозу, гострого мієлоїдного лейкозу, гострого моноцитарного лейкозу, лімфоми, хронічного В-клітинного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу у фазі бластного кризу, лімфоми Беркітта, множинної мієломи, недрібноклітинного раку легенів, дрібноклітинного раку легенів, неходжкінської лімфоми, меланоми, раку простати, раку молочної залози і колоректального раку. Приклади інших пухлин, які можуть бути інгібовані, включають, без обмеження перерахованим, фолікулярний рак щитовидної залози, мієлодиспластичний синдром (MDS), пухлини мезенхімального походження (наприклад, фібросаркоми і рабдоміосаркоми), тератоканциноми, нейробластоми, гліоми, доброякісну пухлину шкіри (наприклад, кератоакантоми), ниркову карциному, карциному яєчників, карциному сечового міхура і епідермальну карциному.

Даний винахід також відноситься до способу лікування гострого лімфобластного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, гострого промієлоцитарного лейкозу, гострого мієлоїдного лейкозу, гострого моноцитарного лейкозу, лімфоми, хронічного В-клітинного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу у фазі бластного кризу, лімфоми Беркітта і множинної мієломи шляхом введення ефективної кількості інгібітору гістонової дезацетилази формули (I) індивідумові, наприклад, ссавцеві (а конкретніше, людині), що потребує такого лікування.

Даний винахід також відноситься до способу лікування резистентних до ліків пухлин, таких як, без обмеження перерахованим, гематопоетичні пухлини лімфоїдного ряду, наприклад, резистентний до ліків гострий лімфобластний лейкоз, резистентний до ліків гострий мієлогенний лейкоз, резистентний до ліків гострий промієлоцитарний лейкоз, резистентний до ліків гострий мієлоїдний лейкоз, резистентний до ліків гострий моноцитарний лейкоз, резистентна до ліків лімфома, резистентний до ліків хронічний В-клітинний лейкоз, резистентний до ліків хронічний мієлоїдний лейкоз, резистентний до ліків хронічний мієлоїдний лейкоз у фазі бластного кризу, резистентна до ліків лімфома Беркітта і резистентна до ліків множинна мієлома, шляхом введення ефективної кількості інгібітору гістонової дезацетилази формули (I), або індивідуально, або у поєднанні з інгібітором протеасоми, індивідумові, наприклад, ссавцеві (а конкретніше, людині), що потребує такого лікування. Даний винахід особливо можна застосовувати для лікування резистентної до ліків множинної мієломи, конкретніше, для лікування множинної мієломи, резистентної до інгібіторів протеасом, ще конкретніше, для лікування множинної мієломи, стійкої до бортезомібу.

Термін «резистентна до ліків множинна мієлома» включає, без обмеження перерахованим, множинну мієлому, стійку до одного або декількох лікарських засобів, вибраних з групи, що складається з талідоміда, дексаметазону, ревліміда, доксорубіцину, вінкристину, циклофосфаміда, памідроната, мелфалана, дефібротида, преднізону, даринапарсина, беліностата, воріностата, PD 0332991, LBH589, LAQ824, MGCD0103, HuLuc63, AZD 6244, пазопаніба, P276-00, плігидепсина, бендамустина, танеспіміцину, ензастаурина, перифозина, ABT-737 або RAD001. Термін «резистентна до ліків множинна мієлома» також включає рецидивуючу або рефрактерну множинну мієлому.

Під терміном «резистентний до ліків» розуміють стан, при якому спостерігається вихідна або надбана стійкість. Під «вихідною резистентністю» розуміють характерний профіль експресії в ракових клітинах основних генів відповідних шляхів, що включають, без обмеження перерахованим, апоптоз, розвиток клітин і відновлення ДНК, який приводить до здатності більш швидкого зростання канцерогенних клітин у порівнянні з їх нормальними аналогами. Під «надбаною резистентністю» розуміють багатофакторну ознаку, що виникає при утворенні і прогресуванні пухлини, яке може впливати на чутливість ракових клітин до лікарського засобу. Надбана резистентність може бути обумовлена декількома механізмами, такими як, без обмеження перерахованим, зміни в комплексах лікарських засобів - мішень, понижена акумуляція лікарського засобу, зміна внутрішньоклітинного розподілу лікарського засобу, понижена взаємодія лікарського засобу з мішенню, підвищена реакція детоксифікації, порушення регуляції клітинного циклу, підвищене відновлення пошкодженої ДНК і понижена реакція апоптозу. Деякі з вказаних механізмів можуть виникати одночасно і можуть взаємодіяти один з одним. Їх активація і інактивація

може бути викликана генетичними або епігенетичними явищами або наявністю онковірусних білків. Надбана резистентність може виникати до окремих лікарських засобів, але також може спостерігатися більш широко відносно різних лікарських засобів, що мають різні хімічні структури і різні механізми дії. Цю форму резистентності називають множинною лікарською резистентністю.

Комбінацію за винаходом можна використовувати для інших терапевтичних цілей, наприклад:

а) підвищення чутливості пухлин до радіотерапії шляхом введення сполуки за винаходом перед, у час або після опромінення пухлини з метою лікування раку;

б) лікування артропатій і захворювань остеоартит, таких як ревматоїдний артрит, остеоартрит, ювенільний артрит, подагра, поліартрит, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт і системний червоний вовчак;

с) інгібування проліферації гладком'язових клітин, включаючи проліферативні розлади судин, атеросклероз і рестеноз;

д) лікування запальних захворювань і захворювань шкіри, таких як виразковий коліт, хвороба Крона, алергічний риніт, захворювання «трансплантат проти господаря», кон'юнктивіт, астма, ARDS, хвороба Бехчета, відторгнення трансплантата, кропив'янка, алергічний дерматит, гнізна алопеція, склеродерма, висип, екзема, дерматоміозит, акне, діабет, системний червоний вовчак, хвороба Кавасаки, розсіяний склероз, емфізема, кістозний фіброз і хронічний бронхіт;

е) лікування ендометріозу, фіброзу матки, дисфункціональної маткової кровотечі і гіперплазії ендометрія;

ф) лікування надлишкової васкуляризації ока, включаючи васкулопатію, що зачіпає судини сітківки і судинне сплетення;

г) лікування порушення серцевої діяльності;

h) інгібування імуносупресуючих захворювань, таке як лікування ВІЛ-інфекції;

i) лікування ниркової недостатності;

j) супресія ендокринних розладів;

k) інгібування порушення глюконеогенезу;

l) лікування нейропатології, наприклад, хвороби Паркінсона або нейропатології, яка приводить до когнітивного розладу, наприклад, хвороби Альцгеймера або нейрональних захворювань, пов'язаних з поліглутаміном;

m) лікування психіатричних розладів, наприклад, шизофренії, біполярного розладу, депресії, стану тривоги і психозу;

n) інгібування нейром'язової патології, наприклад, бічного аміотрофічного склерозу;

o) лікування спінальної м'язової атрофії;

p) лікування інших патологічних станів, що підлягають лікуванню шляхом потенціювання експресії гена;

q) посилення генної терапії;

r) інгібування адипогенеза;

s) лікування паразитарного захворювання, такого як малярія.

Отже, даний винахід відноситься до описаних вище комбінацій для вживання у якості лікарського засобу, а також до застосування інгібітору HDAC

формули (I) з поєднаною активністю відносно HDAC класу I і класу IIb, або самостійно, або у поєднанні з інгібітором протеасоми, для отримання лікарського засобу для лікування одного або декількох з вищезазначених захворювань.

Таким чином, даний винахід відноситься до вживання інгібітору HDAC формули (I) з поєднаною активністю відносно HDAC класу I і класу IIb, або самостійно, або в комбінації, для отримання лікарського засобу для лікування гострого лімфобластного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, гострого промієлоцитарного лейкозу, гострого мієлоїдного лейкозу, гострого моноцитарного лейкозу, лімфоми, хронічного В-клітинного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу у фазі бластного кризу, лімфоми Беркитта і множинної мієломи.

Даний винахід також відноситься до застосування інгібітору HDAC формули (I) з поєднаною активністю відносно HDAC класу I і класу IIb, або самостійно, або в комбінації, для отримання лікарського засобу для лікування резистентних до ліків пухлин, таких як, без обмеження перерахованим, гематопоетичні пухлини лімфоїдного ряду, наприклад, резистентний до ліків гострий лімфобластний лейкоз, резистентний до ліків гострий мієлогенний лейкоз, резистентний до ліків гострий промієлоцитарний лейкоз, резистентний до ліків гострий мієлоїдний лейкоз, резистентний до ліків гострий моноцитарний лейкоз, резистентна до ліків лімфома, резистентний до ліків хронічний В-клітинний лейкоз, резистентний до ліків хронічний мієлоїдний лейкоз, резистентний до ліків хронічний мієлоїдний лейкоз у фазі бластного кризу, резистентна до ліків лімфома Беркитта і резистентна до ліків множинна мієлома.

Даний винахід додатково відноситься до застосування інгібітору HDAC формули (I) з поєднаною активністю відносно HDAC класу I і класу IIb, або самостійно, або в комбінації, для отримання лікарського засобу для лікування резистентної до ліків множинної мієломи, конкретніше, множинної мієломи, стійкої до інгібіторів протеасоми, ще конкретніше, множинної мієломи, стійкої до бортезомібу.

Інгібітор протеасоми і інгібітор HDAC формули (I) можна вводити одночасно (наприклад, в розділених або єдиних композиціях) або послідовно у будь-якому порядку. В останньому випадку дві сполуки мають бути введені в період і в кількості і способом, які достатні для досягнення сприятливого або синергетичного ефекту. Повинно бути зрозуміло, що бажаний спосіб і порядок введення і відповідні дозування і схеми лікування для кожного компонента комбінації залежатимуть від конкретного інгібітору протеасоми і інгібітору HDAC, що вводиться, способу введення комбінації, конкретної оброблюваної пухлини і конкретного господаря, що потребує лікування. Оптимальний спосіб і порядок введення і дозування і схема лікування можуть бути без зусиль визначені фахівцем у даній галузі, використовуючи прийняті способи і в світлі інформації, представленій в даному документі.

Даний винахід додатково відноситься до продукту, що містить у якості першого активного інг-

редієнта інгібітор HDAC формули (I) і у якості другого активного інгредієнта інгібітор протеасоми, у вигляді комбінованого препарату для одночасного, роздільного або послідовного застосування при лікуванні онкологічних хворих.

Фахівець у даній галузі може без зусиль визначити ефективну кількість, ґрунтуючись на результатах випробувань, представлених у даному документі нижче. Як правило, передбачається, що терапевтично ефективна кількість сполуки формули (I) і інгібітору протеасоми складатиме від 0,005 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла і, зокрема, від 0,005 мг/кг до 10 мг/кг маси тіла. Може підходити введення необхідної дози у вигляді двох, трьох, чотирьох або більше субдоз з відповідними інтервалами протягом дня. Вказані субدوزи можуть бути складені у вигляді стандартних лікарських форм, наприклад, таких, що містять від 0,5 до 500 мг і, зокрема, від 10 мг до 500 мг активного інгредієнта на стандартну лікарську форму.

Зважаючи на їх фармакологічні властивості, що використовуються, компоненти комбінацій за винаходом, тобто інгібітор протеасоми і інгібітор HDAC, можуть бути складені в різні фармацевтичні форми залежно від цілей введення. Компоненти можуть бути складені окремо в окремих фармацевтичних композиціях або в єдиній фармацевтичній композиції, що містить обидва компоненти. Інгібітори HDAC можуть бути отримані і складені у фармацевтичні композиції способами, відомими в даній галузі, і, зокрема, відповідно до способів, описаних в опублікованому патентному описі, згаданому в даному документі і наведеному у якості посилання.

Даний винахід, отже, також відноситься до фармацевтичної композиції, що містить інгібітор протеасоми і інгібітор HDAC формули (I) разом з одним або декількома фармацевтичними носіями. Для отримання фармацевтичних композицій для застосування за винаходом ефективна кількість певної сполуки, у формі основно- або кислотно-адитивної солі, у якості активного інгредієнта об'єднують у ретельно перемішаній суміші з фармацевтично прийнятним носієм, який можна вибрати з великого числа форм залежно від форми препарату, наміченої для введення. Ці фармацевтичні композиції бажані в стандартній лікарській формі, відповідній, бажано, для перорального, ректального, черезшкірного введення або введення шляхом парентеральної ін'єкції. Наприклад, при отриманні композицій у лікарській формі для перорального введення можна використовувати, у разі рідких препаратів для перорального введення, таких як суспензії, сиропи, еліксири і розчини, будь-яке загальноприйняте фармацевтичне середовище, таке як, наприклад, вода, гліколи, масла, спирти і тому подібне; або, в разі порошків, пілюль, капсул і пігулок, тверді носії, такі як крохмалі, цукри, каолін, змащуючі речовини, зв'язуючі речовини, дезинтегруючі агенти і тому подібне. Завдяки простоті їх введення, найперважнішою стандартною лікарською формою для перорального введення є пігулки і капсули, у разі яких, очевидно, використовують тверді фармацевтичні носії. У разі парентеральних композицій носій, як правило, міститиме стерильну

воду, щонайменше в значній мірі, хоча можуть бути включені інші інгредієнти, сприяючі, наприклад, розчинності. Можуть бути отримані, наприклад, ін'єкційні розчини, в яких носій містить фізіологічний розчин, розчин глюкози або суміш фізіологічного розчину і розчину глюкози. Також можуть бути отримані ін'єкційні суспензії, у разі яких можна використовувати відповідні рідкі носії, суспендуючі агенти, і тому подібне. У композиціях, прийнятих для черезшкірного введення, носій, необов'язково, містить підсилювач пенетрації та/або прийнятний зволожувач, необов'язково, у поєднанні з відповідними добавками будь-якої природи в незначних кількостях, причому добавки не роблять істотного негативного впливу на шкіру. Вказані добавки можуть полегшувати введення через шкіру та/або можуть сприяти здобуттю бажаних композицій. Ці композиції можна вводити різними способами, наприклад, у вигляді трансдермального пластиру, у вигляді диска, у вигляді мазі.

Особливо бажано для простоти введення і одноманітності дозування складати вищезазначені фармацевтичні композиції в стандартну лікарську форму. Стандартна лікарська форма, як використовується в описі і формулі винаходу даного документа, відноситься до фізично дискретних одиниць, прийнятих у якості одиничних доз, причому кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активного інгредієнта, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту, в асоціації з необхідним фармацевтичним носієм. Прикладами таких стандартних лікарських форм є пігулки (включаючи пігулки з ризкою або покритими пігулками), капсули, пілюлі, пакетики з порошком, облатки, розчини, що ін'єктуються, або суспензії, чайні ложки, столові ложки і тому подібне, і їх роздільні кратні кількості.

Це може бути прийнятним для введення необхідної дози кожного компонента комбінації у вигляді двох, трьох, чотирьох або більше субдоз з відповідними інтервалами впродовж курсу лікування. Субدوزи можуть бути складені у вигляді стандартних лікарських форм, наприклад, таких, що в кожному випадку містять незалежно від 0,01 до 500 мг, наприклад, від 0,1 до 200 мг і, зокрема, від 1 до 100 мг кожного активного інгредієнта на стандартну лікарську форму.

Під терміном «індукція ацетилювання гістонів або інших білків» розуміють індукцію ацетилюваного стану субстратів HDAC, таких як, без обмеження перерахованим, гістони, наприклад гістон 3, гістон 4 і подібні; тубулін, наприклад, альфа-тубулін і подібні; білки теплового шоку, наприклад, Hsp 90 і подібні.

Під терміном «індукція білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням» розуміють вторинні ефекти, такі як, без обмеження перерахованим, індукція Hsp 70, індукція p21 і тому подібне.

Винахід також відноситься до способу характеристики інгібітору HDAC формули (I), або самостійно, або в комбінації з інгібітором протеасоми, що включає визначення в зразку величини індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індук-

ції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням. Конкретніше, винахід відноситься до способу характеристики інгібітору HDAC формули (I), або самостійно, або в комбінації з інгібітором протеасоми, що включає визначення в зразку величини

a) індукції ацетилювання гістону 3, індукції ацетилювання гістону 4 або індукції p21 і

b) індукції ацетилювання альфа-тубуліну, індукції ацетилювання Hsp 90 або індукції Hsp 70.

У найконкретнішому варіанті винахід відноситься до вищезгаданого способу, в якому концентрація, необхідна для отримання індукції згідно з пунктом a), знаходиться в тому ж діапазоні, що і концентрація для отримання індукції згідно з пунктом b).

Визначення в зразку величини індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням, може включати ідентифікацію пацієнтів, які відповідають на лікування і, таким чином, може мати сприятливий ефект відносно лікування раку людини.

Визначення в зразку величини індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням, може включати моніторинг ефективності лікування пацієнтів і, таким чином, може мати позитивний ефект відносно лікування раку людини.

Визначення в зразку величини індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням, може включати прогнозування терапевтичних відповідей на лікування і, таким чином, може мати сприятливий ефект відносно лікування раку людини.

Отже, даний винахід також відноситься до застосування інгібітору HDAC формули (I) з поєднанняю активністю відносно HDAC класу I і класу IIb, або самостійно, або в комбінації з інгібітором протеасоми, де індукція гіперацетилювання гістонів або інших білків, або індукція білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням, має позитивний ефект відносно лікування раку людини.

Зразок може бути отриманий з клітин, які були оброблені вказаним інгібітором HDAC або вказаною комбінацією. Зразок також може бути отриманий з тканини, враженої розладом, і від індивідумів, підданих дії інгібітору HDAC формули (I) або комбінації інгібітору протеасоми і інгібітору HDAC формули (I).

Клітини можуть бути культивованими клітинами, які приводили в контакт з вказаним інгібітором HDAC або вказаною комбінацією. Вказаний інгібітор або вказана комбінація можуть бути додані в середовище для зростання клітин.

Клітини також можуть бути отримані з тканини та/або від індивідуума, підданих дії вказаного інгібітору або вказаної комбінації.

Переважно, спосіб характеристики включає лише стадії, які здійснюються *in vitro*. Тому, згідно з даним варіантом здійснення, стадія отримання

тканинного матеріалу з тіла людини або тварини не охоплюється даним винаходом.

Для визначення індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням, клітини, як правило, обробляють до стану, прийнятного для способу, що використовується. Обробка може включати гомогенізацію, екстракцію, фіксацію, відмивання і пермеабілізацію. Спосіб обробки, в основному, залежить від способу, що використовується для визначення індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням. Зразок може бути отриманий з матеріалу біопсії пацієнта. Матеріал біопсії може бути додатково оброблений для отримання зразка, який знаходиться в стані, прийнятному для способу, що використовується для визначення індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням.

Величину ацетилювання білків або кількість індукованого білка можна визначити, використовуючи антитіло.

Як використовується в даному документі, під терміном «антитіло» розуміють імуноглобулін або його похідне, таке, що має ту ж саму специфічність зв'язування. Антитіло, що використовується за винаходом, може бути моноклональним антитілом або антитілом, отриманим з або таке, що міститься в поліклональній антисироватці. Під терміном «антитіло» додатково розуміють похідні, такі як фрагменти Fab, F(ab')₂, Fv або scFv. Антитіло або його похідне може бути природним або може бути отримано (напів) синтетично.

Можна використовувати вестерн-блоттинг, який, як правило, відомий у даній галузі. Для отримання зразків клітинний матеріал або тканина можуть бути гомогенізовані і оброблені денатуруючими та/або поновлюючими агентами. Зразок можна нанести на поліакриламідний гель для розділення білків з подальшим перенесенням на мембрану або безпосередньо помістити на тверду фазу. Антитіло потім приводять в контакт із зразком. Після однієї або декількох стадій відмивання антитіло, що зв'язалося, визначають, використовуючи методики, які відомі в даній галузі.

Після фіксації і пермеабілізації тканинного матеріалу, наприклад, зрізів твердих пухлин, можна використовувати імуногістохімічне дослідження, антитіло потім інкубують із зразком і після однієї або декількох стадій відмивання визначають антитіло, що зв'язалося.

За допомогою ELISA можна визначити величину індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням. Може бути розглянута велика кількість варіантів ELISA. У одному з варіантів антитіло іммобілізують на твердій фазі, такий як планшет для мікротитрування, з подальшою блокадою сайтів неспецифічного зв'язування і інкубацією із зразком. У іншому варіанті зразок спочатку приводять в контакт з твердою фазою для іммобілізації ацетилюваних та/або індукованих білків, що містяться в зразку. Після

блокування і, необов'язково, відмивання антитіло приводять в контакт з іммобілізованим зразком.

Величину індукції ацетилювання гістонів або інших білків, або індукції білків, функціонально регульованих вказаним ацетилюванням, можна визначити проточною цитометрією. Клітини, наприклад, клітини культури клітин або клітини крові, або клітини кісткового мозку фіксують і підвищують їх проникність, дозволяючи антитілу досягти ацетилюваних та/або індуктованих білків. Після необов'язкового відмивання і стадій блокування антитіло приводять в контакт з клітинами. Для визначення клітин, що мають антитіло, пов'язане з ацетилюваними та/або індуктованими білками, потім здійснюють проточну цитометрію відповідно до методик, відомих у даній галузі.

Для визначення, чи має інгібітор HDAC або комбінація інгібітору протеасоми і інгібітору HDAC формули (I) свою активність, можна визначити величину ацетилювання білка або індукції білка в контрольному зразку, де контрольний зразок отримують з клітин, які не обробляли вказаним інгібітором HDAC або вказаною комбінацією. Визначення величини ацетилювання білка і кількості індуктованого білка в зразку і контрольному зразку можна здійснити паралельно. У разі клітин з культури клітин, отримують дві композиції клітин, одну з яких обробляють вказаним інгібітором HDAC або вказаною комбінацією, тоді як іншу залишають необробленою. Потім обидві композиції додатково обробляють і визначають відносні величини ацетилювання білків і кількість індуктованого білка. Альтернативно, для визначення, чи має інгібітор HDAC або комбінація інгібітору протеасоми і інгібітору HDAC формули (I) свою активність, можна визначити інгібування клітинної проліферації.

У разі пацієнтів, зразок отримують від пацієнта, якого піддавали дії інгібітором HDAC формули (I) або комбінацією інгібітору протеасоми і інгібітору HDAC формули (I). Контрольний зразок отримують від іншого пацієнта, що страждає на той же самий розлад, якого не піддавали дії вказаним інгібітором HDAC або вказаною комбінацією, або від здорового індивідуума. Тканина, з якої отримують контрольний зразок, відповідає тканині, з якої отримують зразок. Наприклад, якщо зразок отримують з тканини пухлини від пацієнта, що страждає на рак молочної залози, то контрольний зразок також отримують з тканини пухлини від пацієнта, що страждає на рак молочної залози, або з тканини молочної залози здорового індивідуума. Також можна передбачити те, що зразок і контрольний зразок отримують від одного і того ж індивідуума. У цьому випадку тканина, з якої отримують контрольний зразок, отримана від індивідуума до або після лікування індивідуума вказаним інгібітором HDAC або вказаною комбінацією. Бажано, тканину отримують до лікування, щоб виключити можливі наслідки лікування інгібітором після припинення лікування.

Експериментальна частина

А. Фармакологічний приклад

Відносно активності сполук формули (I) в плані дії на клітини, яку визначали на клітинах пухлини A2780, використовуючи колориметричний аналіз

для визначення токсичності для клітин або життєздатності клітин (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983), посилаються на експериментальну частину публікації WO 2006/010750.

Антипроліферативні ефекти інгібіторів HDAC були пов'язані з інгібуванням HDAC класу I, який складається з членів сімейства HDAC 1-3 і 8. Активність JNJ 26481585 відносно HDAC 1, імунопреципітованого з клітин A2780, і його потенційні можливості в порівнянні з R306465, SAHA, LBH-589 і LAQ-824 можна знайти в прикладі A.1. Активність JNJ 26481585 відносно HDAC 8, рекомбінантного ферменту людини, і його потенційні можливості в порівнянні з R306465, SAHA, LBH-589 і LAQ-824 можна знайти в прикладі A.2.

Додатково вивчали, чи модулює R306465 стан ацетилювання субстратів HDAC 1 гістону 3 (H3) і гістону 4 (H4). Також вивчали індукцію інгібітору цикліна залежних кіназ p21^{waf1,cip1} у клітинах карциноми яєчника A2780. p21^{waf1,cip1} репресується в результаті ацетилювання гістонів і грає важливу роль в індукції зупинки клітинного циклу у відповідь на інгібітори HDAC (див. приклад A.3.).

Для оцінки інгібування HDAC 6 і відносній активності сполук відносно HDAC 1 у порівнянні з HDAC 6 спостерігали ацетилювання її субстрату тубуліну і індукцію Hsp 70, яка є наслідком ацетилювання Hsp 90 (див. приклад A.4.).

Приклад A: специфічність класу I і ефекти ацетилювання сполук формули (I)

Приклад A.1.: інгібування ферменту HDAC 1, імунопреципітованого з клітин A2780

Для досліджень активності HDAC 1 здійснювали імунопреципітацію HDAC 1 з клітинних лізатів A2780 і інкубували з вказаним інгібітором HDAC, узятим в кількостях, відповідних кривій зміни концентрації, і з [³H]міченим для ацетилю фрагментом пептиду H4 (50,000 імп/хв) [біотин-(6-аміногексановий) Gly-Ala-(ацетил[³H]Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Активність HDAC оцінювали, вимірюючи вивільнення вільних ацетилових груп. Результати виражають у вигляді середніх величин IC₅₀ ± SD для трьох незалежних експериментів.

	IC ₅₀ інгібування HDAC 1 в нМ
JNJ 26481585	0,16±0,02
R306465	3,31±0,78
SAHA	73±26
LAQ-824	0,29±0,05
LBH-589	0,23±0,06

Приклад A.2: інгібування рекомбінантного ферменту людини HDAC 8

Для інгібування рекомбінантного HDAC 8 людини використовували набір для колориметричного/флуориметричного дослідження активності HDAC 8/доставки лікарського засобу (Biomol; Cat. nr. AK-508). Результати виражали у вигляді середніх величин IC₅₀ (нМ) ± SD для трьох незалежних експериментів. Аналізи здійснювали в двох повторках і, використовуючи програму Graphpad Prism (Graphpad Software), розраховували стандартне відхилення IC₅₀.

	IC ₅₀ інгібування HDAC 8 в нМ
JNJ26481585	34±41
R306465	23±17
SAHA	370±314
LAQ-824	37±23
LBH-589	283±29

Приклад А.3: Ацетилювання клітинних субстратів HDAC 1 і індукція p21^{waf1,cip1}

Клітини карциноми яєчника людини A2780 інкубували протягом 24 год із сполуками в концентраціях 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 і 3000 нМ.

Отримували сумарні клітинні лізати і аналізували за допомогою SDS-PAGE. Визначали рівні ацетилюваних гістонів H3 і H4, загальний рівень білків H3 і рівні білка p21^{waf1,cip1}, використовуючи кролячі поліклональні і мишачі моноклональні антитіла з подальшим визначенням посиленої хемілюмінесценції (ECL).

Рівні ацетилюваних H3 і H4 визначали за допомогою антитіл від Upstate Biotechnology (Cat. nr. 06-299 і 06-866), сумарний рівень білків H3 визначали за допомогою антитіл від Abcam (Cat. nr. ab1791), і рівень білка p21^{waf1,cip1} визначали за допомогою антитіл від Transduction Laboratories (Cat. nr. C24420). Антитіла у відповідних розведеннях інкубували протягом або 1-2 год при кімнатній температурі, або протягом ночі при 4°C. Щоб проконтролювати еквівалентне завантаження, блоги вирізали і повторно зондували мишачими моноклональними IgM проти актину (Ab-1, Oncogene Research Products). Для контролю ефективності екстракції ядерних білків блоги вирізали і повторно зондували антитілами проти ламіна B1 (Zymed; Cat. nr. 33.2000). Комплекси білок-антитіло потім візуалізували шляхом хемілюмінесценції (Pierce Chemical Co) або флуоресценції (Odyssey) згідно з інструкціями виробника. Експерименти здійснювали в трьох повторях.

	Концентрація (нМ), при якій спостерігається індукція ацетилювання гістону H3 і H4 і індукція p21 ^{waf1,cip1}
JNJ 26481585	10
R306465	100
SAHA	3000
LAQ-824	10
LBH-589	10

Приклад А.4. Ацетилювання тубуліну і індукція Hsp 70

Клітини карциноми яєчника людини A2780 інкубували із сполуками в концентраціях 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 і 3000 нМ протягом 24 год.

Отримували сумарні клітинні лізати і аналізували за допомогою SDS-PAGE. Рівні загального і ацетилюваного тубуліну визначали, використовуючи антитіла від Sigma: клони DM1A (Cat. nr. T9026) і 6-111B (Cat. nr. T6793). Білок Hsp 70 визначали за допомогою антитіла від Stressgen (Cat. nr. SPA-810) з подальшим визначенням за допомогою ECL. Антитіла у відповідних розведеннях

інкубували протягом або 1-2 год при кімнатній температурі, або протягом ночі при 4°C. Щоб проконтролювати еквівалентне завантаження, блоги вирізали і повторно зондували мишачими моноклональними IgM проти актина (Ab-1, Oncogene Research Products). Для контролю ефективності екстракції ядерних білків блоги вирізали і повторно зондували антитілами проти ламіна B1 (Zymed; Cat. nr. 33.2000). Комплекси білок-антитіло потім візуалізували шляхом хемілюмінесценції (Pierce Chemical Co) або флуоресценції (Odyssey) згідно з інструкціями виробника. Експерименти здійснювали в трьох повторях.

	Концентрація (нМ), при якій спостерігається початок індукції ацетилювання тубуліну і індукції Hsp 70
JNJ 26481585	30
R306465	1000
SAHA	100
LAQ-824	30
LBH-589	30

Приклад В: Інгібування проліферації клітин пухлини кровотворної системи людини

Здійснення оцінки антипроліферативної активності JNJ 26481585 у панелі ліній клітин пухлини кровотворної системи людини передавали фірмі Oncodesign (Dijon, France). Клітини пухлини вирощували у вигляді клітинної суспензії у відповідному прийнятному культуральному середовищі при 37°C в інкубаторі 5% CO₂ з системою зволоження. Вільні від мікоплазми клітини пухлини засівали в 96-лункові плоскодонні планшети для мікротитрування і інкубували при 37°C протягом 24 год в культуральному середовищі, що містить 10% FCS. Пухлинні клітини потім експонували з носієм (контроль) або JNJ 26481585 у підвищених концентраціях (5 різних концентрацій*), бортезомібом (5 різних концентрацій*) або комбінацією обох лікарських засобів в різних співвідношеннях. Клітини потім інкубували протягом додаткових 72 год. Цитотоксичну активність сполуки(сполук) показували за допомогою стандартного аналізу MTS, вимірюючи оптичну щільність при 490 нм. Взаємодії сполук (синергізм, адитивність або антагонізм) розраховували шляхом множинного аналізу ефектів лікарських засобів і здійснювали за допомогою рівняння медіани згідно з методикою, описаною Chou & Talalay [CHOU et al. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55; CHOU et al. (1991) у Encyclopaedia of human Biology. Academic Press. 2: 371-379; CHOU et al. (1991) у Synergism and antagonism in chemotherapy. Academic Press: 61-102; CHOU et al. (1994) J. Natl. Cancer Inst. 86: 1517-1524].

*: на підставі попереднього визначення антипроліферативної активності кожного лікарського засобу, що використовується як самостійний агент, вибирали концентрації, що не перевищують 50% інгібування в кожній з вибраних ліній клітин.

Приклад В.1.: Інгібування проліферації клітин пухлини кровотворної системи людини за допомогою JNJ 26481585.

Таблиця F.1

Результати виражають у вигляді середньої величини IC₄₀ (тобто концентрації, вираженій в нМ, потрібною для досягнення 40% інгібувань клітинної проліферації) \pm SD, визначеною з 3 незалежних достовірних експериментів

Лінія клітин	Тип	Величина	SD
CCRF-CEM	Гострий лімфобластний лейкоз	11,93	7,75
Jurkat clone E6-1	Гострий лімфобластний лейкоз	9,22	7,75
KG-1	Гострий мієлогенний лейкоз	13,39	10,48
MOLT-4	Гострий лімфобластний лейкоз	42,96	56,25
SUP-B15	Гострий лімфобластний лейкоз	1,13	
HL-60	Гострий промієлоцитарний лейкоз	24,28	10,72
OCI-AML2	Гострий мієлоїдний лейкоз	19,56	13,93
THP-1	Гострий моноцитарний лейкоз	50,65	22,84
ENEВ	Хронічний В-клітинний лейкоз	165,81	128,15
BV-173	Хронічний В-клітинний лейкоз	4,54	4,28
K-562	Хронічний мієлоїдний лейкоз	15,91	8,29
KCL-22	Хронічний мієлоїдний лейкоз	7,71	5,14
LAMA-84	Хронічний мієлоїдний лейкоз у фазі бластного кризу	30,40	19,93
U-937	Лімфома	23,67	10,14
Daudi	Лімфома Беркітта	9,08	1,27
Namalwa	Лімфома Беркітта	4,65	4,32
Raji	Лімфома Беркітта	26,34	16,11
Ramos	Лімфома Беркітта	4,66	2,82
ARH-77	Мієлома	40,42	24,32
RPMI8226	Мієлома	6,41	5,44

Приклад В.2.: Інгібування проліферації клітин пухлини кровотворної системи людини за допомогою бортезоміба.

Таблиця F.2

Результати виражають у вигляді середньої величини IC₄₀ (тобто концентрації, вираженій в нМ, потрібною для досягнення 40% інгібувань клітинної проліферації) \pm SD, визначеною з 3 незалежних достовірних експериментів

Лінія клітин	Тип	Величина	SD
CCRF-CEM	Гострий лімфобластний лейкоз	4,40	0,84
Jurkat clone E6-1	Гострий лімфобластний лейкоз	5,63	2,68
KG-1	Гострий мієлогенний лейкоз	3,36	0,83
MOLT-4	Гострий лімфобластний лейкоз	12,14	12,91
SUP-B15	Гострий лімфобластний лейкоз	2,40	
HL-60	Гострий промієлоцитарний лейкоз	13,38	1,99
OCI-AML2	Гострий мієлоїдний лейкоз	11,64	11,61
THP-1	Гострий моноцитарний лейкоз	5,83	0,94
ENEВ	Хронічний В-клітинний лейкоз	6,02	0,34
BV-173	Хронічний В-клітинний лейкоз	2,77	0,20
K-562	Хронічний мієлоїдний лейкоз	12,83	4,11
KCL-22	Хронічний мієлоїдний лейкоз	1,74	1,56
LAMA-84	Хронічний мієлоїдний лейкоз у фазі бластного кризу	2,61	0,46
U-937	Лімфома	5,68	1,07
Daudi	Лімфома Беркітта	2,68	0,54
Namalwa	Лімфома Беркітта	4,48	1,00
Raji	Лімфома Беркітта	5,20	0,69
Ramos	Лімфома Беркітта	1,83	0,10
ARH-77	Мієлома	7,21	2,22
RPMI8226	Мієлома	4,23	0,99

Приклад В.3: Інгібування проліферації клітин пухлини кровотворної системи людини за допомогою JNJ 26481585 в комбінації з бортезомібом.

Таблиця F.3

Результати виражають у вигляді середнього індексу комбінації ($CI \pm SD$) усереднених величин CI в кожному окремому дослідженні (3 незалежних достовірних експеримента) і розраховують з кожного окремого співвідношення комбінації. CI менше 0,9 вказує на «синергізм» (сірий колір), а CI в інтервалі між 0,91 і 1,09 вказує на «адитивність» (білий)

	Величина	SD
CCRF-CEM	0,75	0,10
Jurkat	0,80	0,15
KG-1	0,96	0,26
MOLT-4	0,85	0,17
SUP-B15	0,81	0,03
HL-60	0,81	0,24
OCI-AML2	0,71	0,12
THP-1	0,94	0,25
EHEB	0,62	0,11
0,76	0,05	
K-562	0,75	0,25
KCL-22	0,96	0,26
LAMA-84	1,05	0,27
U-937	0,67	0,06
Daudi	0,87	0,18
Namalwa	0,58	0,08
Raji	0,80	0,08
Ramos	0,89	0,36
ARH-77	0,90	0,34
RPMI8226	0,76	0,06