



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 77200

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/395

A61K 31/4706

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИНЕОПЛАСТИЧНА КОМБІНАЦІЯ CCI-779 І ЕКВ-569

1

2

(21) 2004031662

(22) 06.08.2002

(24) 15.11.2006

(86) PCT/US02/24841, 06.08.2002

(31) 60/310,646

(32) 07.08.2001

(33) US

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Рабіндран Срідхар Крішна, US, Гіббонс
Джеймс Дж., US

(73) УАЙТ, US

(56) Gupta R A et al: "Combinations for cancer
prevention." NATURE MEDICINE, (2000 SEP) 6 (9)
974-5., XP002223840

Torrance C J et al: "Combinatorial chemoprevention
of intestinal neoplasia." NATURE MEDICINE, (2000
SEP) 6 (9) 1024-8, XP002223841

(57) 1. Спосіб лікування новоутворення у ссавця,
потребуючого вказаного лікування, який включає
введення вказаному ссавцеві ефективної кількості
комбінації, що включає CCI-779 і ЕКВ-569.

2. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою рак нирки.

3. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою саркому м'яких тканин.

4. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою рак молочної залози.

5. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою нейроендокринну пухлину легені.

6. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою рак шийки матки.

7. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою рак матки.

8. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою рак голови і шиї.

9. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє со-
бою гліому.

10. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой недрібноклітинний рак легені.

11. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой рак передміхурової залози.

12. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой рак підшлункової залози.

13. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой лімфому.

14. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє

собой меланому.

15. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой дрібноклітинний рак легені.

16. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой рак яєчника.

17. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой рак товстого кишечника.

18. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой рак стравоходу.

19. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой рак шлунка.

20. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой лейкоз.

21. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой колоректальний рак.

22. Спосіб за п.1, в якому новоутворення являє
собой невідомий первинний рак.

23. Спосіб за будь-яким з пп.1-22, який включає
введення вказаному ссавцеві ефективної кількості
комбінації, що включає CCI-779 і ЕКВ-569, в якому
CCI-779, ЕКВ-569 або обидва вводять в субтера-
певтично ефективних кількостях.

24. Спосіб за п.23, в якому CCI-779 вводять в суб-
терапевтично ефективній кількості.

25. Спосіб за п.23, в якому ЕКВ-569 вводять в суб-
терапевтично ефективній кількості.

26. Спосіб за п.23, в якому CCI-779 і ЕКВ-569 вво-
дять в субтерапевтично ефективних кількостях.

27. Антинеопластична комбінація, яка включає
антинеопластично ефективну кількість комбінації
CCI-779 і ЕКВ-569.

28. Композиція за п.27, в якій CCI-779 міститься в
субтерапевтично ефективній кількості.

29. Композиція за п.27, в якій ЕКВ-569 міститься в
субтерапевтично ефективній кількості.

30. Композиція за п.27, в якій CCI-779 і ЕКВ-569
містяться в субтерапевтично ефективних кількос-
тях.

31. Продукт, що включає CCI-779 і ЕКВ-569, у ви-
гляді комбінованого препарату для одночасного,
роздільного і послідовного застосування для ліку-
вання новоутворення у ссавця.

32. Продукт за п.31, в якому новоутворення являє
собой одне з наступних захворювань: рак нирки,
саркому м'яких тканин, рак молочної залози, ней-
роендокринну пухлину легені, рак шийки матки,

(13) C2

(11) 77200

(19) UA

рак матки, рак голови і шиї, гліому, недрібноклітинний рак легені, рак передміхурової залози, рак підшлункової залози, лімфому, меланому, дрібноклітинний рак легені, рак яєчника, рак товстого кишечника, рак стравоходу, рак шлунка, лейкоз, колоректальний рак або невідомий первинний рак.

33. Застосування CCI-779 і ЕКВ-569 для виготовлення лікарського засобу для лікування новоутворення у ссавця.

34. Застосування за п.33, при якому новоутворення являє собою одне з наступних захворювань: рак нирки, саркому м'яких тканин, рак молочної залози, нейроендокринну пухлину легені, рак шийки матки, рак матки, рак голови і шиї, гліому, недрібноклітинний рак легені, рак передміхурової

залози, рак підшлункової залози, лімфому, меланому, дрібноклітинний рак легені, рак яєчника, рак товстого кишечника, рак стравоходу, рак шлунка, лейкоз, колоректальний рак або невідомий первинний рак.

35. Застосування за п.33 або 34, при якому CCI-779 вводять в субтерапевтично ефективній кількості.

36. Застосування за п.33 або 34, при якому ЕКВ-569 вводять в субтерапевтично ефективній кількості.

37. Застосування за п.33 або 34, при якому CCI-779 і ЕКВ-569 вводять в субтерапевтично ефективних кількостях.

Даний винахід відноситься до застосування комбінацій ефіру-42 рапаміцину і 3-гідрокси-2-(гідроксиметил)-2-метилпропіонової кислоти (CCI-779) і [4-(3-хлор-4-фторфеніламін)-3-ціан-7-етоксигіолін-6-іл]амідом 4-диметиламінобут-2-енової кислоти (ЕКВ-569).

Рапаміцин являє собою макроциклічний триєновий антибіотик, продукований *Streptomyces hygroscopicus*, який, як було встановлено, володіє протигрибковою активністю, особливо, проти *Candida albicans*, як *in vitro*, так і *in vivo* [C. Vezina et al., J. Antibiot. 28, 721 (1975); S.N. Sehgal et al., J. Antibiot. 28, 727 (1975); H.A. Baker et al., J. Antibiot. 31, 539 (1978); патент США №3 929 992 і патент США №3 993 749]. Крім того, як було показано, рапаміцин окремо [патент США №4 885 171] або в комбінації з піцибанілом [патент США №4 401 653] володіє пропипухлинною активністю.

Імуносупресивні ефекти рапаміцину описані [в FASEB 3, 3411 (1989)]. Циклоспорин А і FK-506, інші макроциклічні молекули, також, як було показано, є ефективними як імуносупресивні агенти, придатними, таким чином, для запобігання відторгненню трансплантата [FASEB 3, 3411 (1989); FASEB 3, 5256 (1989); R.Y. Calne et al. Lancet 1183 (1978) і патент США №5 100 899]. R. Martel et al. [Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 48 (1977)] повідомили, що рапаміцин є ефективним на експериментальній моделі алергічного енцефаломієліту, моделі розсіяного склерозу, на допоміжній моделі артриту, моделі ревматоїдного артриту, і ефективно інгібує утворення IgE-подібних антитіл.

Рапаміцин також є придатним для профілактики або лікування системного червоного вовчака [патент США №5 078 999], запалення легень [патент США №5 080 899], інсулінзалежного цукрового діабету [патент США №5 321 009], шкірних хвороб, таких як псоріаз [патент США №5 286 730], хвороб кишечника [патент США №5 286 731], проліферації гладком'язевих клітин і потовщення інтими після пошкодження судини [патенти США №5 288 711 і 5 516 781], Т-клітинного лейкозу/лімфоми дорослих [Європейська патентна заявка 525 960 A1], запалення очей [патент США №5 387 589], злоякісних карцином [патент США №5 206 018], запального захворювання серця [патент США №5 496 832] і анемії [патент США №5 561 138].

Ефір-42 рапаміцину з 3-гідрокси-2-(гідроксиметил)-2-метилпропіоновою кислотою (CCI-779) являє собою складний ефір рапаміцину, який продемонстрував значну інгібуючу дію на ріст пухлин як на *in vitro*, так і на *in vivo* моделях. Отримання і застосування гідроксифірів рапаміцину, включаючи CCI-779, описано [в патенті США №5 362 718].

CCI-779 виявляє цитостатичні, протиставлені цитотоксичним, властивості, і може затримувати час, який проходить до початку прогресування пухлин, або час, який проходить до появи рецидиву пухлин. CCI-779, як вважають, володіє механізмом дії, який схожий на механізм дії sirolimus. CCI-779 зв'язується з білком цитоплазми FKBP і утворює з ним комплекс, який інгібує фермент, mTOR (ціль рапаміцину у ссавців, також відомий як FKBP 12-рапаміцинзв'язувальний білок [FRAP]). Інгібування кіназної активності mTOR інгібує ряд шляхів перетворення сигналів, включаючи клітинну проліферацію, яка стимулюється цитокінами, трансляцію мРНК для декількох ключових білків, які регулюють G1 фазу клітинного циклу, і IL-2-індуковану транскрипцію, що приводить до інгібування ходу клітинного циклу від G1 до S. Механізм дії CCI-779, який блокує фазу від G1 до S, є новим для пропипухлинного лікарського засобу.

In vitro було встановлено, що CCI-779 інгібує ріст ряду гістологічно відмінних пухлинних клітин. Рак центральної нервової системи (ЦНС), лейкоз (Т-клітинний), рак молочної залози, рак міхурової залози і меланомні лінії були серед найбільш чутливих до CCI-779. Дана сполука зупиняла клітини в фазі G1 клітинного циклу.

In vivo експерименти на безтимусних мишах показали, що CCI-779 володіє активністю проти ксенотрансплантатів пухлин людини різних гістологічних типів. Гліоми були особливо чутливими до CCI-779, і сполука була активною відносно моделі ортотопічної гліоми у безтимусних мишей. Стимуляція клітинної лінії людської гліобластоми, індукована фактором росту (отриманим з тромбоцитів), *in vitro* виражено придушувалася CCI-779. Ріст декількох пухлин підшлункової залози людини у безтимусних мишей, а також однієї з двох ліній раку молочної залози, вивчених *in vivo*, також придушувався CCI-779.

Протеїн-тирозин-кінази являють собою клас

ферментів, які каналізують перенесення фосфатної групи з АТФ або ГТФ на залишок тирозину, розташований на білкових субстрат. Протеїн-тирозин-кінази грають роль в нормальному рості клітин. Багато які з рецепторних білків фактора росту діють як тирозин-кінази, і саме за допомогою даного процесу вони впливають на сигнальні процеси. Взаємодія факторів росту з даними рецепторами є необхідною для нормальної регуляції росту клітин. Однак, в певних умовах, внаслідок мутації або надмірної експресії, дані рецептори можуть ставати розрегульованими, що приводить до неконтрольованої проліферації клітин, яка може виразитися в пухлинному рості і, в кінцевому результаті, в захворюванні, відомому як рак [Wilks A.F., Adv. Cancer Res., 60, 43 (1993) і Parsons, J.T.; Parsons, S.J., Important Advances in Oncology, DeVita V.T. Ed., J.B. Lippincott Co., Phila., 3 (1993)]. Серед рецептор-кіназ фактора росту і їх протоонкогенів, які були ідентифіковані і які є мішенями для сполук за даним винаходом, знаходяться рецептор-кіназа епідермального фактора росту (EGF-R-кіназа, білковий продукт онкогена *erbB*) і продукт, що виробляється *erbB-2* (також звані *neu* або *HER2*) онкогеном. Оскільки фосфорилювання є необхідним для початку розподілу клітин сигналом, і оскільки понадміру експресовані або мутовані кінази пов'язані зі злоякісною пухлиною, інгібітор даного процесу, інгібітор протеїн-тирозин-кінази, буде мати терапевтичну цінність для лікування злоякісної пухлини і інших захворювань, які характеризуються неконтрольованим або патологічним ростом клітин. Наприклад, надмірна експресія продукту рецептор-кінази онкогена *erbB-2* пов'язана з раком молочної залози і яєчника у людини [Slamon, D.J., et al., Science, 244, 707 (1989) і Science, 235, 1146 (1987)]. Розрегулювання EGF-R кінази пов'язане з епідермоїдними пухлинами [Reiss, M., et al., Cancer Res., 51, 6254 (1991)], пухлинами молочної залози [Macías A., et al., Anticancer Res., 7, 459 (1987)] і пухлинами, що вражають інші основні органи [Gullick, W.J., Brit. Med. Bull., 47, 87 (1991)]. Внаслідок важливості ролі, яку грають розрегульовані рецептор-кінази в патогенезі злоякісної пухлини, багато які недавні дослідження торкаються розробки специфічних інгібіторів РТК як потенційних протиракових терапевтичних агентів [деякі огляди, що недавно вийшли: Burke, T.R., Drugs Future, 17, 119 (1992) і Chang, C.J.; Geahlen, R.L., J. Nat. Prod., 55, 1529 (1992)].

[4-(3-хлор-4-фторфеніламін)-3-ціан-7-етоксигінолін-6-іл]амід 4-диметиламінобут-2-енової кислоти (ЕКВ-569) являє собою інгібітор EGFR-кінази, який володіє значною інгібуючою дією на ріст пухлин, як на моделях *in vitro*, так і *in vivo*. Отримання і застосування інгібіторів EGFR-кінази, таких як ЕКВ-569, описано [в патенті США №6 002 008].

Фіг.1 показує криві цитотоксичності ЕКВ-569, CCI-779 і комбінацій ЕКВ-569+CCI-779 відносно клітин HCT116.

Фіг.2 показує ізоболограми (при 50% рівні ефекту) комбінації ЕКВ-569+CCI-779.

Фіг.3 показує ізоболограми для комбінацій ЕКВ-569+CCI-779, отримані з різних кінцевих па-

раметрів, що варіюють від 50 до 65%.

Фіг.4 показує тривимірний просторовий аналіз синергічної взаємодії комбінації ЕКВ-569+CCI-779.

Фіг.5 показує контурну діаграму просторового графіка синергізму комбінації ЕКВ-569+CCI-779.

Даний винахід відноситься до застосування комбінацій CCI-779 і ЕКВ-569 як антинеопластичної комбінованої хіміотерапії. Зокрема, дані комбінації є відповідними для лікування раку нирок, раку м'яких тканин, раку молочної залози, нейроендокринної пухлини легені, раку шийки матки, раку матки, раку голови і шиї, гліоми, недрібноклітинного раку легені, раку передміхурової залози, раку підшлункової залози, лімфоми, меланоми, дрібноклітинного раку легені, раку яєчника, раку товстого кишечника, раку стравоходу, раку шлунка, лейкозу, колоректального раку і невідомого первинного раку. Даний винахід відноситься до комбінацій CCI-779 і ЕКВ-569 для застосування як антинеопластичної комбінованої хіміотерапії, в яких дозування CCI-779 або ЕКВ-569 або обох застосовується в субтерапевтичному ефективному дозуванні.

Термін "лікування", що використовується в даному винаході, означає лікування ссавця, що має неопластичне захворювання, за допомогою забезпечення вказаного ссавця ефективною кількістю комбінації CCI-779 і ЕКВ-569 з метою інгібування росту неоплазми у вказаного ссавця, ліквідації неоплазми або полегшення стану ссавця.

Термін "забезпечення", що використовується в даному винаході, в тому, що стосується забезпечення комбінацією, означає пряме введення комбінації або введення проліків, похідного або аналога одного або обох компонентів комбінації, які будуть утворювати ефективну кількість комбінації в організмі.

Отримання CCI-779 описано [в патенті США №5 362 718], який включений в цей документ як посилання. Знайдене отримання CCI-779 описано [в патентній заявці США №SN 09/670 358], яка включена в цей документ як посилання. У випадку, коли CCI-779 застосовують як антинеопластичний агент, передбачають, що дози первинної в/в інфузії складуть приблизно від 0,1 до 100 мг/м² при схемі введення один раз на день (щодня, протягом 5 днів, кожні 2-3 тижні) і приблизно від 0,1 до 1000 мг/м² при схемі введення один раз на тиждень. Пероральний шлях або внутрішньовенна інфузія є переважними шляхами введення, більш переважним є внутрішньовенний шлях.

ЕКВ-569 можна отримати відповідно до методів, описаних [в патенті США №6 002 008], який включений в цей документ як посилання. Переважні методи отримання ЕКВ-569 представлені в цьому документі. У випадку, коли ЕКВ-569 застосовують як антинеопластичний агент, передбачають, що первинна пероральна доза складе приблизно від 1 до 100 мг на день. У залежності від толерантності пацієнта, ЕКВ-569 можна вводити щодня протягом періоду лікування, такого як 14 днів, з подальшим періодом відпочинку (коли лікарський засіб не вводять), або можна вводити на постійній основі протягом більш тривалого періоду лікування (наприклад, 6 місяців або більше).

Антинеопластична активність комбінації CCI-

779 плюс EKB-569 була підтверджена в стандартному фармакологічному дослідженні *in vitro*, далі стисло описана використана методика і отримані результати.

Методика з використанням клітинної проліферації - клітини аденокарциноми товстого кишечника HCT 116 вирощували на середовищі RPMI 1640 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) доповненого 10% фетальною бичачою сироваткою (FBS, Life Technologies) і 50мкг/мл гентаміцину (Life Technologies), в атмосфері 7% CO₂ при 37°C. Клітини вміщували в 96-ямкові мікротитраційні планшети (6000 клітин на ямку) в 200мкл середовища RPMI 1640, що містить 5% FBS і 50мкг/мл гентаміцину, і інкубували протягом ночі при 37°C. Виготовляли розведення сполуки в тому ж середовищі, з кінцевою концентрацією 5X, і 50мкл розведених лікарських засобів додавали в ямки, що містили клітини. Для вивчення комбінацій двох лікарських засобів серійне розведення однієї сполуки виготовляли в присутності фіксованої дози другої сполуки. Альтернативно, використали контрольні серії розведення. Клітини культивували протягом трьох днів в присутності лікарських засобів. Клітини, на які не впливали лікарськими засобами, включали в експеримент як контроль. Процентну частку клітин, що вижили, визначали з використанням сульфородаміну В (SRB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), фарби, зв'язуючої білки. Клітинний білок осаджували в кожній ямці додаванням 50мкл 50% холодної розчину трихлороцтової кислоти. Через 1 годину планшети рясно промивали водою і висушували. Додавали як реагент фарбу SRB (0,4% SRB в 1% оцтової кислоті, 80мкл на ямку), і планшети тримали при кімнатній температурі протягом десяти хвилин. Потім планшети ретельно промивали 1% оцтовою кислотою і висушували. Фарбу, пов'язану з клітинами, розчиняли в 10мМ Tris (150мкл) і прочитували поглинання на 540нм на мікротитраційному планшеті-рідері. Концентрацію сполуки, яка викликала фіксовану процентну частку інгібування росту визначали побудовою графіка залежності виживання клітин (відносно клітин, що не зазнавали впливу) від дози сполуки.

Оцінка синергізму - Для вивчення взаємодії двох фармакологічних агентів використали ізоболограми. У цьому випадку, концентрацію кожного лікарського засобу окремо, яка викликала певний кінцевий параметр (наприклад, 50% інгібування росту клітин, IC₅₀), наносили на дві графічні осі. Прямая лінія, що з'єднує дві точки, являє собою рівно ефективні концентрації всіх комбінацій двох лікарських засобів, якщо взаємодія є чисто сумарною. Зсув ізоболограми ліворуч від прогнозованої цитотоксичності (крива угнутою стороною вгору) являє собою синергічну взаємодію. Навпаки, зсув праворуч (крива опуклою стороною вгору) являє собою антагоністичну взаємодію. У випадку, коли ізоболограми для різних кінцевих точок вміщували на один і той же графік, концентрацію кожного лікарського засобу виражали як частину концентрації кожного лікарського засобу окремо, яка давала той же ефект. Це дає симетричну ізоболограму із заходами, що не мають одиниць, на кожній осі, і дозволяє провести пряме порівняння різних кінцевих точок.

Другу модель вивчення лікарських взаємодій запропонували Prichard і Shipman [Antiviral Research, 14: 181-206 (1990)]. Це тривимірна модель: по одній для кожного лікарського засобу і третя - для біологічного ефекту. Теоретичні сумарні взаємодії розраховують по окремих кривих доза-відповідь, на основі моделі сумарної дії з використанням несхожих ділянок (незалежність Bliss). Розраховану сумарну поверхню, що являє собою прогнозовану цитотоксичність, віднімають від експериментальної поверхні, для виявлення площ посиленої токсичності (синергізм) або зменшеної токсичності (антагонізм). Отримана поверхня виглядає як горизонтальна площина при 0% інгібування над розрахованою сумарною поверхнею, якщо взаємодія є сумарною. Піки і заглиблення, що відхиляються від даної площини, вказують на синергізм і антагонізм, відповідно. Для автоматизації всіх розрахунків використали комп'ютерну програму MacSynergyII на основі Microsoft Excel. Дана програма розраховує теоретичні сумарні взаємодії і локалізує і кількісно визначає синергічні або антагоністичні взаємодії, які є достовірними при 95% довірчих рівнях. Результати наносили на тривимірний графік або контурний графік.

Результати - Були вибрані клітини HCT 116, оскільки вони експресують низькі, але рівні EGFR, що піддаються виявленню, і є чутливими до інгібування інгібіторами EGFR. Дані клітини володіють деякою резистентністю до CCI-779, але високими дозами даного лікарського засобу (5-10мкг/мл) інгібуються. Клітини HCT-116 культивували в присутності EKB-569 окремо, CCI-779 окремо або серії розведень EKB-569 з фіксованими дозами CCI-779. Після росту протягом 3 днів виживання клітин визначали за допомогою тест-процедури SRB. Криві цитотоксичності показані на Фіг.1. На клітинах HCT116 EKB-569 давав величину IC₅₀ 0,31мкг/мл. Коли дану сполуку комбінували з 2,08мкг/мл CCI-779 (який викликав 41% інгібування росту при окремому використанні), величина IC₅₀ зменшилась до 0,03мкг/мл, тобто була в 10 раз менше. При комбінуванні з 0,026мкг/мл CCI-779 (який інгібує проліферацію клітин при окремому використанні на 36%), величина IC₅₀ падала до 0,051мкг/мл, тобто була в 6 раз меншою. Схожі результати спостерігалися, коли криві доза-відповідь отримували з використанням CCI-779 в присутності фіксованих доз EKB-569. Для того, щоб ідентифікувати природу даної лікарської взаємодії, отримували ізоболограми (при рівні ефекту 50%) комбінації EKB-569 і CCI-779 (Фіг.2). Ізоболограма мала глибоку звивину угнутою стороною вгору, що вказує на значну синергічну взаємодію двох лікарських засобів. У найбільш синергічній точці 0,03мкг/мл EKB-569, об'єднаний з 0,077мкг/мл CCI-779, мав ізо-ефективність з 0,31мкг/мл EKB-569 окремо або 4,3мкг/мл CCI-779 окремо (IC₅₀ для кожного лікарського засобу окремо). Таким чином, 10-кратне зменшення дози EKB-569 і 50-кратне зменшення дози CCI-779 було потрібно для інгібування проліферації клітин на 50%, коли лікарські засоби були об'єднані, в порівнянні з кожним з лікарських засобів окремо. Також вивчали ізоболограми, отримані з різних кінцевих точок,

що варіюють від 50 до 65%. Як показано на Фіг.3, отримані ізоболограми майже повністю накладалися одна на одну, що вказує на синергізм на всіх випробуваних рівнях ефекту.

Взаємодію між ЕКВ-569 і ССІ-779 оцінювали також з використанням просторового аналізу. У цьому випадку фармакологічні взаємодії представлені на просторовій діаграмі з площиною на 0%, що являє собою сумарну взаємодію, з піками і заглибленнями, що являють собою площі синергізму або антагонізму, відповідно, між двома лікарськими засобами. На Фіг.4 комбінація ЕКВ-569 і ССІ-779 дала обширну площу синергічної взаємодії, узгоджувану з результатами, показаними при вивченні ізоболограм. Контурний графік просторової синергічної діаграми полегшує ідентифікацію концентрацій лікарських засобів, при яких спостерігається найбільша синергічна токсичність (Фіг.5). Обширна площа синергізму спостерігалася при концентрації від 0,0005 до 3мкг/мл ССІ-779 і від 0,16 до 0,4мкг/мл ЕКВ-569. У межах вказаної площі спостерігалася два піки максимального синергізму при концентрації від 0,0005 до 0,003мкг/мл і від 0,05 до 0,3мкг/мл ССІ-779 і від 0,25 до 0,37мкг/мл ЕКВ-569.

На основі результатів описаних стандартних методик фармакологічних випробувань, комбінації ССІ-779 плюс ЕКВ-569 діяли синергічно, і є придатними як антинеопластична терапія. Більш конкретно, дані комбінації є придатними для лікування раку нирки, раку м'яких тканин, раку молочної залози, нейроендокринної пухлини легені, раку шийки матки, раку матки, раку голови і шиї, гліоми, недрібноклітинного раку легені, раку передміхурової залози, раку підшлункової залози, лімфоми, меланоми, дрібноклітинного раку легеня, раку яєчника, раку товстого кишечника, раку стравоходу, раку шлунка, лейкозу, колоректального раку і невідомого первинного раку. Оскільки дані комбінації містять щонайменше два активних антинеопластичних агентів, застосування даних комбінацій також забезпечує застосування комбінацій кожного з агентів, в яких один або обидва агенти застосовують в субтерапевтично ефективному дозуванні, зменшуючи, таким чином, токсичність, пов'язану з окремим хіміотерапевтичним агентом.

При проведенні хіміотерапії множина агентів, що мають різні механізми дії, звичайно використовують як частину хіміотерапевтичного «коктейлю». Можна передбачувати, що комбінації за даним винаходом будуть використовуватися як частина хіміотерапевтичного «коктейлю», який може містити один або більше додаткових антинеопластичних агентів, в залежності від природи новоутворення, з приводу якого буде проводитися лікування. Наприклад, даний винахід також відноситься до застосування комбінації ССІ-779/ЕКВ-569, що застосовується в поєднанні з іншими хіміотерапевтичними агентами, такими як антиметаболіти (тобто, 5-фторурацил, флоксурадин, тіогуанін, цитарабін, флударабін, 6-меркаптопурин, метотрексат, гемцитабін, капецитабін, пентостатин, триметотрексат або кладрибін), агенти зшиття ДНК і алкілюючі агенти (тобто, цисплатин, карбоплатин, стрептазоїн, мелфалан, хлорамбуцил, кармустин, метклоретамін, ломустин, бісультан, тіо-

тепа, іфофамід або циклофосфамід); гормональні агенти (тобто, тамоксифен, ролосифен, тореміфен, анастрозол або летрозол); антибіотики (тобто, пликаміцин, блеоміцин, мітоксантрон, ідарубіцин, дактиномицин, мітоміцин, доксорубіцин або даунорубіцин); імуномодулятори (тобто, інтерферони, ІЛ-2 або BCG); антимітотичні агенти (тобто, естрамустин, паклітаксел, доцетаксел, вінбластин, вінкрестин або вінорелбін); інгібітори топоізомерази (тобто, топотекан, іринотекан, етопозид або теніпозид) і інші агенти (тобто, гідроксисечовина, трастузумаб, алтретамін, ретуксумаб, L-аспарагіназа або гемтузумаб озгоаміцин).

При використанні за даним винаходом режим введення комбінації може бути одночасним або ступінчастим; при цьому ССІ-779 вводять в різний з ЕКВ-569 час протягом курсу хіміотерапії. Ця різниця у часі між введеннями двох агентів може варіювати від декількох хвилин, годин, днів, тижнів або більше. Отже, термін «комбінація» не обов'язково означає введення в один і той же час або у вигляді єдиної дози, але що кожний з компонентів вводять протягом бажаного періоду лікування. Агенти також можна вводити різними шляхами. Наприклад, у випадку комбінації ССІ-779 плюс ЕКВ-569 можна очікувати, що ССІ-779 будуть вводити перорально або парентерально, переважно, парентерально, в той час як ЕКВ-569 можна вводити парентерально, перорально або іншими прийнятними способами. Дану комбінацію можна вводити один раз на день, один раз на тиждень і навіть один раз на місяць. Звичайним для схем хіміотерапії є те, що курс хіміотерапії можуть повторювати декількома тижнями пізніше, і можуть дотримуватися тих же тимчасових рамок для введення двох агентів, або можуть виробляти модифікації, ґрунтуючись на реакції пацієнта на лікування.

Звичайним для хіміотерапії є те, що схеми введення лікарських засобів ретельно контролює лікуючий лікар, ґрунтуючись на численних факторах, включаючи тяжкість захворювання, реакцію на захворювання, будь-яку пов'язану з лікуванням токсичність, вік, стан здоров'я пацієнта і інші супутні захворювання або види лікування.

На основі результатів, отриманих при використанні комбінацій ССІ-779 плюс ЕКВ-569, можна прогнозувати, що первинна доза при в/в інфузії ССІ-779 буде складати приблизно від 0,1 до 100мг/м², переважно, приблизно від 2,5 до 70мг/м². Також переважно вводити ССІ-779 в/в, звичайно протягом періоду часу більш 30 хвилин, і приблизно один раз на тиждень. Первинні добові дози ЕКВ-569 будуть складати приблизно від 1 до 100мг, переважно, від 5 до 75мг. Після одного або більше курсу лікування дозування можуть бути змінені в сторони збільшення або зменшення, в залежності від отриманих результатів і побічних ефектів, що спостерігаються.

Препарати для перорального введення, що містять активні сполуки за даним винаходом, можуть включати будь-які звичайні пероральні форми, включаючи таблетки, капсули, букальні форми, облатки, пастилки і рідини, суспензії або розчини для перорального введення. Капсули можуть містити суміші активної сполуки (сполук) з

інертними наповнювачами і/або розріджувачами, такими як фармацевтично прийнятний крохмаль (наприклад, кукурудзяний, картопляний крохмаль або крохмаль з тапіоки), цукор, штучні підсолоджувачі, порошкоподібна целюлоза, така як кристалічна і мікрокристалічна целюлози, коригенти, желатин, камеді і т.п. Відповідні таблетовані препаратні форми можна виготовляти звичайними способами пресування, вологого гранулювання або сухого гранулювання і використати фармацевтично прийнятні розріджувачі, зв'язувальні агенти, змашувальні агенти, розпушувачі, агенти, що модифікують властивості поверхонь (включаючи сурфактанти), суспензуючі або стабілізуючі агенти, включаючи, без обмеження, стеарат магнію, стеаринову кислоту, тальк, лаурилсульфат натрію, мікрокристалічну целюлозу, кальцій-карбоксиметилцелюлозу, полівінілпіролідон, желатин, альгінову кислоту, аравійську камедь, ксантанову камедь, цитрат натрію, складні силікати, карбонат кальцію, гліцин, декстрин, сахарозу, сорбіт, двокальцієвий фосфат, сульфат кальцію, лактозу, каолін, маніт, хлорид натрію, тальк, сухий крохмаль і порошкоподібний цукор. Переважні агенти, що модифікують властивості поверхонь, включають неіоногенні і аніоногенні агенти, що модифікують властивості поверхонь. Приклади агентів, що змінюють властивості поверхонь, включають, без обмеження, полксамер 188, хлорид бензалконію, стеарат кальцію, цетостеариловий спирт, емульгуючий віск цетомакрогол, складний ефір сорбітану, колоїдний діоксид кремнію, фосфати, додецилсульфат натрію, алюмосилікат магнію і триетаноламін. Препарати для перорального введення за даним винаходом можуть використати звичайні препарати з уповільненням або відстроченим вивільненням для зміни всмоктування активної сполуки (сполук). Препарат для перорального введення може також перебувати з активного інгредієнта у воді або фруктовому соку, що містить відповідні солюбілізуючі або емульгуючі агенти, якщо це необхідно.

У деяких випадках може бути бажаним введення сполуки безпосередньо в дихальний шлях в формі аерозолі.

Сполуку можна також вводити парентерально або інтраперитонеально. Розчини або суспензії даних активних сполук у вигляді вільної основи або фармакологічно прийнятної солі можна виготовляти у воді, належно змішаній з сурфактантом, таким як гідроксипропілцелюлоза. Дисперсії також можна виготовляти в гліцерині, рідких поліетиленгліколях і їх сумішах в маслах. У звичайних умовах зберігання і використання даний препарат містить консервант для запобігання росту мікроорганізмів.

Фармацевтичні форми, відповідні для ін'єкцій, включають стерильні водні розчини або стерильні порошки для виготовлення безпосередньо перед вживанням стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій. У всіх випадках лікарська форма повинна бути стерильною і повинна бути досить рідкою, щоб її можна було вводити за допомогою шприца. Вона повинна бути стабільною при умовах виробництва і зберігання і повинна бути захищена від контамінуючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби. Носій може являти собою розчинник або диспергуюче середовище, що містить, наприклад,

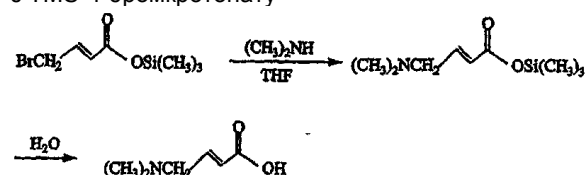
воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь), відповідні суміші даних агентів і рослинні олії.

Для цілей даного опису під черезшкірним введенням розуміють всі способи введення через поверхню тіла і внутрішні вистілки шляхів організму, включаючи епітеліальні тканини і тканини слизових оболонок. Вказане введення можна здійснювати з використанням даних сполук або їх фармацевтично прийнятних солей, в лосьйонах, кремах, пінках, пластирах, суспензіях, розчинах і супозиторіях (ректальних і вагінальних).

Черезшкірне введення можна здійснювати з використанням черезшкірного пластиру, що містить активну сполуку і носій, який є інертним по відношенню до активної сполуки, нетоксичним по відношенню до шкіри і дозволяє доставляти агент для системного всмоктування в кровотік через шкіру. Носій може приймати будь-яку кількість форм, таких як креми і мазі, пасти, гелі і закриті пристрої. Креми і мазі можуть являти собою в'язкі рідкі або напівтверді емульсії типу «масло у воді» або «вода в маслі». Пасти, складені з абсорбуючих порошків, диспергованих в нафті або гідрофільній нафті, що містять активний інгредієнт, також можуть бути відповідними. Ряд закритих пристроїв можна використати для вивільнення активного інгредієнта в кровотік, таких як напівпроникна мембрана, яка покриває резервуар, що містить активний інгредієнт з носієм або без носія, або матрикс, який містить активний інгредієнт. Інші закриті пристрої відомі фахівцям. Препарати в формі супозиторіїв можна виготовляти з традиційних матеріалів, включаючи масло какао з доданням або без додання воску для зміни температури плавлення супозиторію, і гліцерин. Також можна використовувати водорозчинні основи для супозиторіїв, такі як поліетиленгліколи з різною молекулярною масою.

Наступна інформація забезпечує отримання ЕКВ-569 з комерційно доступних початкових матеріалів або початкових матеріалів, які можна отримати, спираючись на описані в науковій літературі процедури.

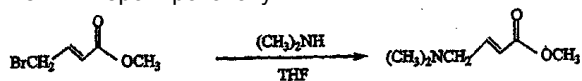
Отримання 4-диметиламінокротонової кислоти з TMS-4-бромкротонату



211мл диметиламіну (2М в ТГФ, 0,422моль) по краплях додавали до розчину 50г TMS-4-бромкротонату (0,211моль, 75,9% по ГХ-МС) в 250мл ТГФ при 0-50°C в атмосфері N₂. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Білий твердий побічний продукт відфільтровували. До фільтрату додавали 2мл води з подальшим внесенням затравки. Утворені кристали відфільтровували і промивали, з отриманням 18,3г (з двох зборів) твердого продукту не зовсім білого кольору. Вихід становив 67,2% (98% чистота по ГХ-МС, ЯМР відповідав структурі).

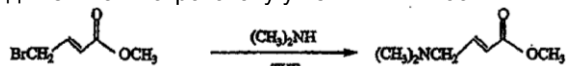
Отримання метил 4-диметиламінокротононату з

метил-4-бромкротонату



120мл диметиламіну (2М в ТГФ, 0,24моль) по краплях додавали до розчину 20г метил 4-бромкротонату (85% чистоти, 0,095моль) в 150мл ТГФ при 0-50°C в атмосфері N₂. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. ТШХ (9:1 CH₂Cl₂: MeOH з декількома краплями Et₃N) показала залишковий метил 4-бромкротонат. Реакційну суміш перемішували при 40-45°C протягом 15 хвилин. Білий твердий побічний продукт відфільтровували. Фільтрат випаровували з отриманням жовтого масла (14г). Жовте мало розчиняли в 100мл CH₂Cl₂ і промивали два рази H₂O. Водний шар знову екстрагували 100мл CH₂Cl₂. Шари CH₂Cl₂ об'єднували, висушували над MgSO₄ і фільтрували. Фільтрат випаровували з отриманням масла (12г). Вихід становив 88%. ЯМР показав бажаний продукт із залишковими кількостями метил 4-бромкротонату.

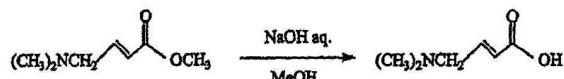
Отримання гідрохлориду метил 4-N,N-диметиламінокротонової кислоти у великій кількості:



У 3л колбу вмішували тетрагідрофуран (0,71кг, 0,80л). Додавали метил 4-бромкротонат (0,20кг, 0,13л, пл.=1,522г/мл) і промивали тетрагідрофураном (0,18кг, 0,20л). Розчин перемішували і охолоджували до 0-10°C. Додаткову воронку завантажували розчином диметиламіну в тетрагідрофурані і додавали зверху (1год. 15хв.), зберігаючи температуру 0-10°C. Суміш перемішували мінімум протягом 30хв. і перевіряли на завершення реакції за допомогою ТШХ.

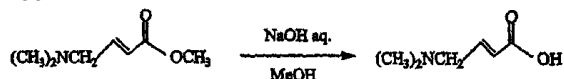
Реакція була завершена, коли залишалося < 2% початкового матеріалу, що виявляється (метил 4-бромкротонату). Суміш в холодному стані фільтрували через воронку Бюхнера в 3л колбу з декількома горлами, промивали заздалегідь охолодженням (0-10°C) тетрагідрофураном (2×0,18кг, 2×0,20л) і зберігали розрідження до припинення подачі розчину по краплях. Колба була забезпечена мішалкою, термометром і пристроєм для вакуумної дистиляції. Розчин концентрували дистиляцією при зниженому тиску (125-200мм рт.ст.) і при максимальній температурі резервуара (40°C) до об'єму (200мл). Додавали ізопропанол (0,22кг, 0,28л) і суміш охолоджували до 0-10°C. Головку перегінного пристрою замінювали додатковою воронкою, завантаженою розчином HCl в ізопропанолі, який додавали більше 45хв. до досягнення pH2,0-3,0, при підтримці температури 0-10°C. Суміш залишали в спокої мінімум на 30хв. і вмішували її в холодному стані на воронку Бюхнера, промивали ізопропанолом (2×0,12кг, 2×0,15л). Осад на фільтрі заливали і зберігали розрідження до припинення подачі розчину по краплях. Продукт висушували у вакуумній печі при 50°C і 10мм рт.ст. протягом 18-20 години.

Отримання гідрохлориду 4-диметиламінокротонової кислоти з метил 4-диметиламінокротононату



Розчин NaOH (3,35г в 25мл H₂O, 0,084моль) по краплях додавали до розчину 12 г метил 4-диметиламінокротононату (0,084моль) в 100мл MeOH при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали до 40-45°C протягом 1 години, потім охолоджували до кімнатної температури. pH доводили до 1-2 за допомогою 5N HCl. Суміш концентрували до стану густого масла, який розтирали в зневодненому спирті до утворення твердої речовини. Твердий побічний продукт відфільтровували. Фільтрат випаровували до стану масла, який розтирали в IPA. Отримували сім (7,0)г білого твердого продукту. Вихід становив 50%, чистота по ГХ-МС 86,3%.

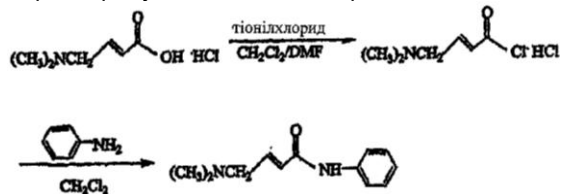
Отримання гідрохлориду 4-N,N-диметиламінокротонової кислоти у великій кількості:



2л колба з декількома горлами була забезпечена мішалкою, термометром, додатковою воронкою і азотним захистом. У колбу завантажували етанол (0,39кг, 0,50л). Додавали гідрохлорид метил 4-N,N-диметиламінокротононату (0,125кг) і промивали етанолом (0,10кг, 0,125л). Суспензію перемішували і охолоджували до 0-10°C. Додаткову воронку завантажували гідроксидом натрію (50%) (0,11кг, 0,072л, пл. =1,53г/мл) і додавали протягом більше 20 хвилин, підтримуючи температуру 0-10°C. Спостерігалось виділення невеликої кількості тепла, і суміш набувала жовтого кольору. Суміш перемішували протягом мінімум 15хв., а потім підігрівали до 18-22°C і залишали в спокої мінімум на 4 години. Реакцію перевіряли на завершення за допомогою ТШХ. Реакція була завершена, коли залишалося ≤2% початкового матеріалу, що виявляється (гідрохлориду метил 4-N,N-диметиламінокротононату). Суміш охолоджували до 0-10°C. Додаткову воронку завантажували розчином HCl в ізопропанолі і додавали більше 40хв. до досягнення pH2,0-3,0, при підтримці температури резервуара 0-10°C. Суміш перемішували протягом мінімум 30хв. і в холодному стані фільтрували через воронку Бюхнера в 2л колбу з декількома горлами, промивали холодним етанолом (0-10°C) (2×0,05кг, 2×0,063л), зберігаючи розрідження до припинення подачі розчину по краплях. Колба була забезпечена мішалкою, термометром і пристроєм для вакуумної дистиляції. Розчинник видаляли при зниженому тиску 50-100мм рт.ст. і при максимальній температурі резервуара (40°C) до об'єму 160-180мл. Додавали ізопропанол (0,049кг, 0,063л) і суміш підігрівали до 35-40°C протягом більше 10хв. Додавали ацетон (0,10кг, 0,13л) протягом більше 20хв., підтримуючи температуру 35-

40°C. У суміш вміщували затравку і охолоджували до кімнатної температури 20-25°C і залишали у вказаному стані мінімум на 12-18 годину. Суміш охолоджували до 0-10°C і залишали у вказаному стані мінімум на 1 годину. Готували суміш ізопропанолу (0,049кг, 0,063л) і ацетону (0,10кг, 0,13л), перемішували до однорідності і охолоджували до 0-10°C. Суміш фільтрували в холодному стані на воронку Бюхнера, промивали сумішшю ізопропанол/ацетон (2×0,074кг, 2×0,096л), а осад на фільтрі заливали, зберігаючи розрідження до припинення подачі розчину по краплях. Продукт висушували у вакуумній печі при 50°C і 10мм рт.ст. протягом 18-20 годин.

Отримання 4-диметиламінокротоноіланиліду з гідрохлориду 4-диметиламінокротонової кислоти



Тіонілхлорид (0,36мл, 0,005моль) по краплях додавали до розчину 0,33г гідрохлориду 4-диметиламінокротонової кислоти (0,002моль) в 15мл CH_2Cl_2 , що містить 2 краплі ДМФА при 0°C в атмосфері N_2 . Реакційну суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30хв. Потім до реакційної суміші по краплях додавали 0,72мл аніліну (0,008моль) при 0°C і перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Твердий побічний продукт відфільтровували. Фільтрат випаровували, з отриманням масла (0,6г). Дані ГХ-МС показали, що масло містило 11,7% гідрохлориду 4-диметиламінокротонової кислоти і 85% бажаних продуктів.

Отримання і виділення гідрохлориду 4-N,N-диметиламінокротоноилхлориду

Добре перемішену суспензію гідрохлориду 4-диметиламінокротонової кислоти (5,0г, 30ммоль) в холодному (0°C) ТГФ (40мл) і ДМФА (2 краплі з піпетки) обробляли оксалілхлоридом (3,15мл, 36ммоль). Суміш перемішували при 20-25°C протягом 3 години, потім охолоджували до 0°C і залишали у вказаному стані на 30хв. Тверді речовини збирали на воронку Бюхнера (під шаром азоту) і

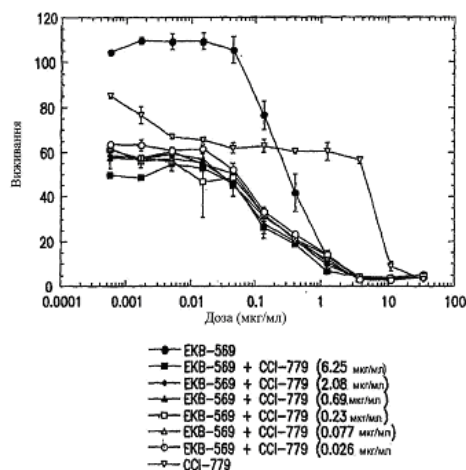
промивали холодним (0°C) ТГФ (3×5мл). Продукт висушували в умовах вакууму (~1торр) при 40-50°C протягом 3 годин, з отриманням 4,0г гідрохлориду 4-диметиламінокротоноілхлориду. Даний матеріал характеризується як його метиловий ефір при обробці твердої речовини метанолом.

Альтернативно, вказану в заголовку сполуку можна отримувати в CH_3CN і використати безпосередньо на стадії скріплення:

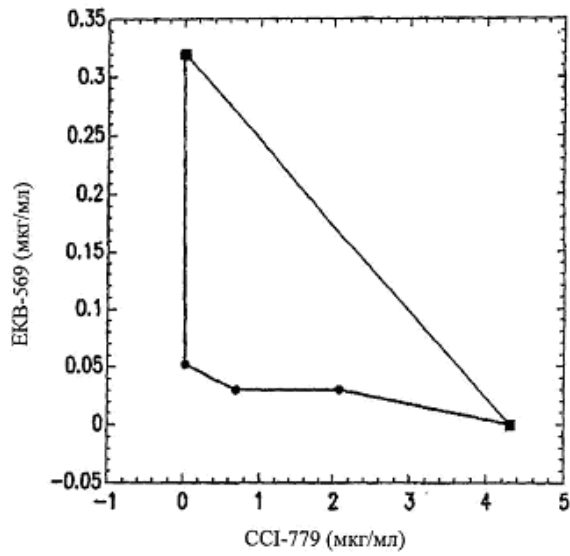
Отримання ЕКВ-569

3л колба з декількома горлами була забезпечена мішалкою, термометром, зануреною трубкою і азотним захистом. У колбу завантажували N-метилпіролідіон (0,77кг, 0,75л, пл.=1,033г/мл). При кімнатній температурі додавали 4-[3-хлор-4-фторфеніл]амін-6-аміно-3-ціан-7-етоксихінолін (0,0748кг) [див. патент США №6 002 008] і суміш перемішували при нагріванні до 40-45°C і залишали у вказаному стані на 15 хв. Колбу охолоджували до 0-10°C. Суміш, що містила гідрохлориду 4-N,N-диметиламінокротоноілхлориду, переносили за допомогою зануреної трубки і при позитивному тиску азоту в 3л колбу протягом більше 30-45хв., підтримуючи температуру 0-10°C. Суміш залишали в спокої при 0-10°C мінімум на 2 години. Реакцію перевіряли на завершення за допомогою ВЕРХ. Реакція була завершена, коли залишалося ≤2% початкового матеріалу (4-[3-хлор-4-фторфеніл]амін-6-аміно-3-ціан-7-етоксихіноліну).

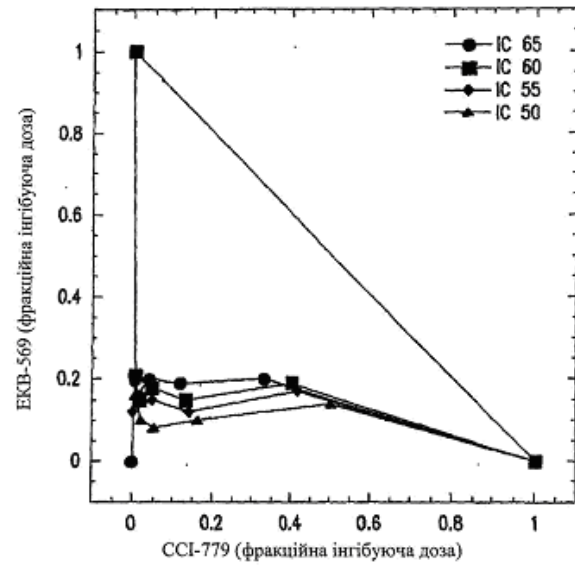
12л колбу з декількома горлами, забезпечену мішалкою, термометром, зануреною трубкою і азотним захистом, завантажували водою (2,61кг, 2,61л). Додавали бікарбонат натрію (0,209кг) і перемішували до отримання розчину. Розчин охолоджували до 20-24°C. Суміш NMP- CH_3CN переносили за допомогою зануреної трубки і при позитивному тиску азоту в 12л колбу протягом більше 45-60хв., підтримуючи температуру 20-24°C. Суміш підтримували при 20-24°C протягом мінімум 1 години і фільтрували на воронку Бюхнера, промивали водою (3×0,40кг, 3×0,40л), зберігаючи розрідження до припинення подачі розчину по краплях. Продукт висушували у вакуумній печі при 50°C і 10мм рт.ст. протягом 28-30 годин, з отриманням 78,5г (вихід 86%) продукту.



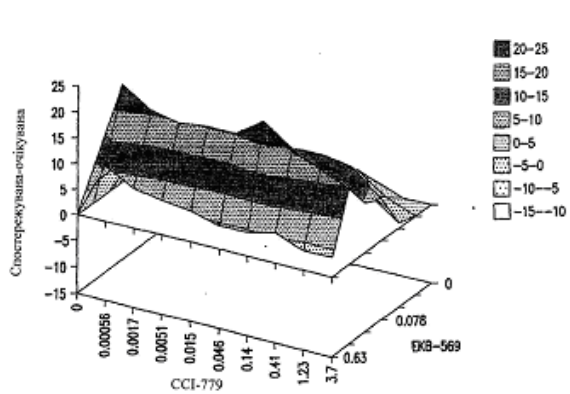
Фір. 1



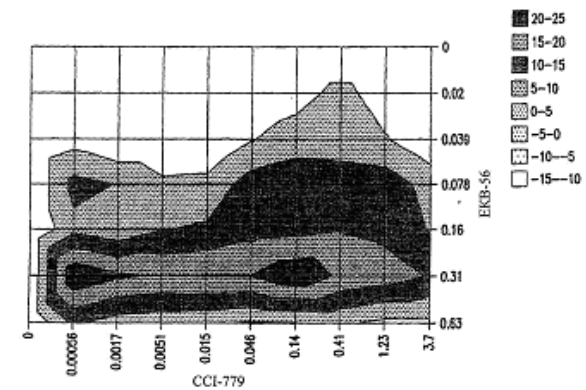
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5