

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035100**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.28

(21) Номер заявки
201690276

(22) Дата подачи заявки
2009.10.21

(51) Int. Cl. *A61K 31/454* (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЕПТИД ЭПОКСИКЕТОНОВ

(31) **61/196,945**

(32) **2008.10.21**

(33) **US**

(43) **2016.10.31**

(62) **201170592; 2009.10.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ОНИКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Кирк Кристофер Дж., Демо Сьюзан Д.,
Беннетт Марк К. (US)**

(74) Представитель:

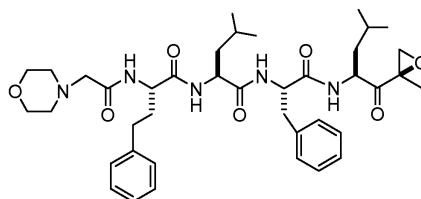
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-AI-20070293465

US-A1-20080152646

DEMO SUSAN D. et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor, *Cancer Res*, 2007, vol. 67:(13), pp. 6383-6391, реферат, фиг. 1, с. 6391

(57) Изобретение относится к комбинированной терапии, а именно к способу лечения множественной миеломы, в частности рецидивирующей множественной миеломы, включающему введение пациенту комбинации, содержащей: (1) ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу



или его фармацевтически приемлемую соль, (2) леналидомид и (3) дексаметазон, где указанная комбинация ингибитора пептид эпоксикетон, леналидомид и дексаметазона демонстрирует эффективность, превосходящую эффективность любого из упомянутых средств при их индивидуальном введении.

B1**035100****035100****B1**

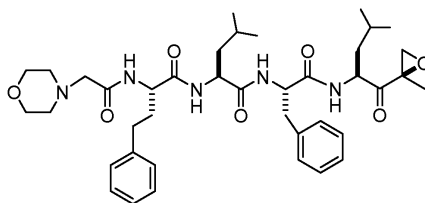
Предпосылки изобретения

В организмах эукариот распад белка преимущественно опосредуется убиквитиновым путем, при котором белок, предназначенный для разрушения, связывается с полипептидом убиквитином, состоящим из 76 аминокислотных остатков. После введения этого нацеливающего фрагмента, убиквитинированные белки играют роль субстрата для протеасомы 26S, т.е. мультикаталитической протеазы, которая расщепляет белки на короткие пептиды, за счет проявления трех основных видов своей протеолитической активности. Играя основную роль во внутриклеточном обороте белков, опосредованное протеасомой разрушение играет также ключевую роль во многих процессах, как, например, презентации главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, апоптозе, делении клеток и активации NF-κB.

Протеасома 20S представляет собой мультикаталитический протеазный комплекс цилиндрической формы с массой 700 кДа, включающий 28 субъединиц, входящих в 4 цикла, играющий важную роль в регулировке клеточного роста, презентации главного комплекса гистосовместимости класса I, апоптозе, процессинге антигенов, активации NF-κB и передаче провоспалительных сигналов. У дрожжей и других эукариот внешнее кольцо сформировано из 7 различных α-субъединиц, и внутреннее кольцо образовано 7 различными β-субъединицами. α-Субъединицы служат сайтами связывания регуляторных комплексов 19S (PA700) и 11S (PA28), а также физической границей для внутренней протеолитической полости, образованной двумя циклами β-субъединиц. Таким образом, считается, что *in vivo* протеасома существует в форме частиц 26S ("26S протеасома"). Эксперименты *in vivo* показали, что ингибирование формы 20S протеасомы может быть легко скоррелировано с ингибированием 26S протеасомы. Отщепление аминоконцевых пропоследовательностей β-субъединиц при образовании частиц оставляет открытыми аминоконцевые остатки треонина, которые выполняют функцию каталитических нуклеофилов. Таким образом, субъединицы, отвечающие за каталитическую активность протеасомы, обладают нуклеофильными аминоконцевыми остатками, и эти субъединицы принадлежат к семейству гидролаз с N-концевым нуклеофилом (Ntn) (в которых нуклеофильный N-концевой остаток представляет собой, например, Cys, Ser, Thr и другие нуклеофильные фрагменты). Это семейство включает, например, пенициллин G ацилазу (PGA), пенициллин V ацилазу (PVA), глутамин PRPP амидотрансферазу (GAT) и бактериальную гликозиласпарагиназу. Кроме β-субъединиц, экспрессируемых всеми эукариотами, у высших позвоночных имеются также три γ-интерферониндуцируемые β-субъединицы (LMP7, LMP2 и MECL1), которые присутствуют вместо их обычных аналогов X, Y и Z соответственно, меняя, тем самым, каталитическую активность протеасомы. С помощью различных пептидных субстратов были определены три основных вида протеолитической активности протеасомы 20S эукариот: хомотрипсинподобная активность (CT-L), которая вызывает расщепление после крупных гидрофобных остатков; трипсинподобная активность (T-L), которая вызывает расщепление после основных остатков; и пептидил-глутамил пептид гидролизующая активность (PGPH), которая приводит к расщеплению после кислотных остатков. Кроме того, протеасоме было приписано два дополнительных, менее характерных вида активности: BrAAP активность, которая вызывает расщепление после аминокислотных остатков с разветвленной цепью; и SNAAP активность, которая приводит к расщеплению после небольших нейтральных аминокислот. Основной вклад в протеолитическую активность протеасомы, по-видимому, вносят различные каталитические сайты, поскольку ингибиторы, точечные мутации в β-субъединицах и замена γ-интерферониндуцирующих β-субъединиц меняет разные виды активности в различной степени.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения множественной миеломы, где способ включает введение пациенту комбинации, содержащей: (1) ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу



или его фармацевтически приемлемую соль, (2) леналидомид и (3) дексаметазон, где указанная комбинация ингибитора пептид эпоксикетон, леналидомида и дексаметазона демонстрирует эффективность, превосходящую эффективность любого из упомянутых средств при их индивидуальном введении.

В предпочтительном варианте предложенного способа леналидомид вводят пациенту в дозе, составляющей по меньшей мере 15 мг/м², более предпочтительно в дозе, составляющей по меньшей мере 20 мг/м².

В ещё одном предпочтительном варианте предложенного способа, где ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, и леналидомид вводят одновременно.

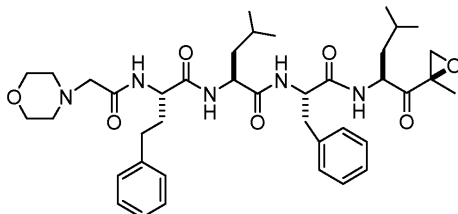
В ещё одном предпочтительном варианте предложенного способа леналидомид вводят в течение от примерно 5 мин до примерно 48 ч до или после введения ингибитора протеасомы, представляющего со-

бой пептид эпоксикетон.

В частном случае реализации предложенного способа множественная миелома представляет собой рецидивирующую множественную миелому.

В ещё одном предпочтительном варианте предложенного способа ингибитор пептид эпоксикетон вводят пациенту в дозе, составляющей по меньшей мере 15 мг/м².

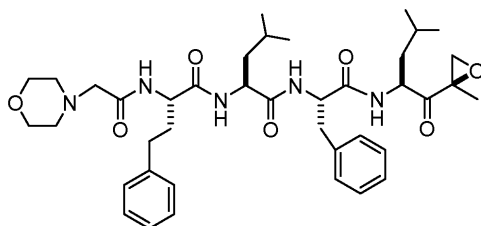
Настоящее изобретение также относится к применению ингибитора протеасомы, представляющего собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу



или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с леналидомидом и дексаметазоном для лечения множественной миеломы, где указанная комбинация ингибитора пептид эпоксикетон, леналидомида и дексаметазона демонстрирует эффективность, превосходящую эффективность любого из упомянутых средств при их индивидуальном введении.

В частном случае реализации предложенного изобретения множественная миелома представляет собой рецидивирующую множественную миелому.

Ещё одним объектом настоящего изобретения является способ лечения рецидивирующей множественной миеломы, включающий введение пациенту комбинации, содержащей: (1) ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу



или его фармацевтически приемлемую соль, (2) леналидомид и (3) дексаметазон.

Краткое описание иллюстративного материала

На фиг. 1 показан график зависимости объема опухоли от времени для мышей, получавших носитель, соединение 1, SAHA или соединение 1 в комбинации с SAHA, после того, как размер опухоли, состоящей из клеток RL, достигал примерно 50 мм³;

на фиг. 2A - расписание введения препаратов для комбинированной терапии с применением доксила и соединения 1;

на фиг. 2B - результаты исследования токсичности для комбинированной терапии с применением доксила и соединения 1, где доксил вводят в дозировке 10 или 20 мг/кг и соединение 1 вводят в дозировке 5 мг/кг;

на фиг. 3 - зависимость размера колоректальной опухоли HT29 от времени при введении носителя, доксила (3 мг/кг), соединения 1 (5 мг/кг) и комбинации соединения 1 и доксила;

на фиг. 4 - зависимость размера немелкоклеточной опухоли легких A549 от времени при введении носителя, доксила (3 мг/кг), соединения 1 (5 мг/кг) и комбинации соединения 1 и доксила;

на фиг. 5A - расписание введения препаратов для комбинированной терапии с применением доцетаксела и соединения 1;

на фиг. 5B - результаты исследования токсичности для комбинированной терапии с применением доцетаксела и соединения 1, где доцетаксел вводят в дозировке 10 мг/кг и соединение 1 вводят в дозировке 5 мг/кг;

на фиг. 6 - зависимость размера немелкоклеточной опухоли легких A549 от времени при введении носителя, соединения 1 (5 мг/кг), доцетаксела (5 мг/кг) и комбинации соединения 1 и доцетаксела;

на фиг. 7 - зависимость размера немелкоклеточной опухоли легких A549 от времени при введении носителя, соединения 1 (3 мг/кг), доцетаксела (3 мг/кг) и комбинации соединения 1 и доцетаксела;

на фиг. 8A - расписание введения препаратов для комбинированной терапии с применением SAHA и соединения 1;

на фиг. 8B - результаты исследования токсичности для комбинированной терапии с применением вориностата и соединения 1, где SAHA вводят в дозировке 50 мг/кг и соединение 1 вводят в дозировке 3 или 5 мг/кг;

на фиг. 9 - зависимость размера лимфомы RL от времени при введении носителя, соединения 1 (3 мг/кг), SAHA (50 мг/кг) и комбинации соединения 1 и SAHA;

на фиг. 10 - зависимость размера опухоли яичников ES2 от времени при введении носителя, соединения 1 (5 мг/кг), SAHA (50 мг/кг) и комбинации соединения 1 и SAHA;

на фиг. 11 - действие комбинации соединения 1 и мелфалана на клетки MM1.S;

на фиг. 12A - предварительные результаты фазы Ib исследования с наращиванием дозы, в котором использовалась комбинация карфилзомиба и леналидомида с дексаметазоном в низкой дозировке, у пациентов с рецидивирующей множественной миеломой. В первых трех группах семнадцать пациентов подходили для оценки реакции и токсичности. Максимальная переносимая доза (MTD) не была достигнута и не сообщалось о серьезных нежелательных явлениях 3 или 4 степени, связанных с препаратами;

на фиг. 12B - предварительные результаты фазы Ib исследования с наращиванием дозы, в котором использовалась комбинация карфилзомиба и леналидомида с дексаметазоном в низкой дозировке, у пациентов с рецидивирующей множественной миеломой. Реакция носила долговременный характер.

Подробное описание изобретения

В описании "фермент" может являться любой частью или полностью белковой молекулой, которая способствует каталитическому протеканию химической реакции. Эти ферменты могут являться нативными ферментами, слитыми ферментами, проферментами, апоферментами, денатурированными ферментами, фарнезилированными ферментами, убиквитинированными ферментами, ферментами, ацилированными жирными кислотами, геранил-геранилированными ферментами, GPI-связанными ферментами, липид-связанными ферментами, пренилированными ферментами, природными или искусственными мутантными ферментами, ферментами с модификациями боковых цепей или основной цепи, ферментами с лидерными последовательностями и ферментами, образовавшими комплекс с небелковыми веществами, например протеогликанами, протеолипосомами. Ферменты можно получать различными путями, включая природную экспрессию, промотируемую экспрессию, клонирование, пептидный синтез в растворе и на твердой фазе и подобные способы, известные специалистам в данной области техники.

Термин "ингибитор" в настоящей заявке предназначен для описания соединения, которое блокирует или уменьшает активность фермента (например, ингибирование протеолитического расщепления стандартных флуорогенных пептидных субстратов). Ингибитор может вызывать конкурентное, бесконкурентное или неконкурентное ингибирование. Ингибитор может связываться обратимо или необратимо, и, следовательно, этот термин охватывает соединения, которые являются суицидными субстратами фермента. Ингибитор может вызывать изменения одного или нескольких участков в пределах или вблизи от активных сайтов фермента, или он может вызывать конформационные изменения на любом участке молекулы фермента.

Термины "профилактика" или "предупреждение" приняты в технике, и при их использовании в связи с болезненным состоянием, например местным рецидивом (например, боли), заболеванием, например, раком, комплексом синдромов, например сердечной недостаточностью, или любым другим медицинским состоянием, эти термины хорошо понятны специалистам в данной области и включают введение композиции, которая уменьшает частоту появления или замедляет возникновение симптомов медицинского состояния у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим эту композицию. Так, профилактика рака включает, например, сокращение частоты выявляемых случаев роста опухоли в группе пациентов, получающих профилактическое лечение, по сравнению с контрольной группой, не получающей лечения, и/или отсрочку появления выявляемого роста раковых опухолей в группе, получавшей лечение, по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения, например, в статистически и/или клинически значимом количестве. Профилактика инфекции включает, например, сокращение числа диагнозов данной инфекции в группе, получавшей профилактическое лечение, по сравнению с контрольной группой, не получавшей профилактического лечения, и/или отсрочку появления симптомов инфекции в группе, получавшей профилактическое лечение, по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения. Профилактика боли включает, например, уменьшение силы болевых ощущений или в качестве альтернативы отсрочку появления ощущения боли у субъектов группы, получавшей профилактическое лечение, по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения.

Термин "профилактическое или терапевтическое" лечение принят в данной области техники и включает введение субъекту одной или нескольких композиций по настоящему изобретению. Если введение осуществлялось до клинических проявлений нежелательного состояния (например, заболевания или другого нежелательного состояния у животного реципиента), то лечение является профилактическим (т.е. лечение предохраняет реципиента от развития нежелательного состояния), в то же время, если введение происходит после проявления нежелательного состояния, то лечение является терапевтическим (т.е. оно предназначено для уменьшения, облегчения или стабилизации существующего нежелательного состояния или его побочных эффектов).

Подразумевается, что термин "протеасома" в настоящем описании включает иммуно- и конститутивные протеасомы.

"Терапевтически эффективное количество" соединения, применительно к способу лечения по настоящему изобретению, относится к количеству соединения(соединений) в препарате, которые при введении в качестве составной части желаемой схемы лечения (млекопитающим, предпочтительно человеку) облегчают симптомы, улучшают состояние или замедляют наступление болезненных состояний, со-

гласно клинически приемлемым стандартам для подвергаемого лечению расстройства или состояния, или косметической цели, например, при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению.

В настоящем описании термин "лечение" включает обращение развития, уменьшение или купирование симптомов, клинических признаков и лежащей в их основе патологии для улучшения или стабилизации состояния субъекта.

Комбинированная терапия.

В настоящем описании термин "схема лечения" означает заранее определенное расписание применения одного или нескольких терапевтических средств для лечения рака. Соответственно, если терапевтическое средство вводят "отдельно", схема лечения не включает применение другого терапевтического агента для лечения рака.

Комбинации, описанные в настоящем изобретении, имеют синергическую природу, т.е. терапевтическое действие комбинации пептид эпоксикетона и другого терапевтического средства(средств) превышает сумму эффектов отдельных компонентов.

Описанные в настоящем изобретении соединения можно вводить в различных формах в зависимости от заболевания, лечение которого осуществляется, а также возраста, состояния и массы тела пациента, что хорошо известно в технике. Например, если соединения предполагается вводить перорально, их можно включать в состав таблеток, капсул, гранул, порошков или сиропов; или с целью парентерального введения их можно включить в состав препаратов для инъекции (внутривенной, внутримышечной или подкожной) или препаратов для капельной инфузии. Эти составы можно получать обычными способами, и, если это желательно, действующий ингредиент можно смешать с любой обычной добавкой или наполнителем, например связующим веществом, дезинтегрирующим агентом, смазывающим средством, корригирующим веществом, солюбилизующим средством, суспендирующим средством, эмульгирующим агентом, средством для формирования покрытия, циклодекстрином и/или буфером. Дозировка должна меняться в зависимости от симптомов, возраста и массы тела пациента, природы и тяжести расстройства, которое предполагается лечить или предупреждать, пути введения или лекарственной формы. Количество действующего ингредиента, которое можно смешать с носителем для получения единицы дозированной лекарственной формы, как правило должно являться таким количеством соединения, которое вызывает терапевтический эффект.

В одном из вариантов описанные в настоящей заявке соединения можно вводить в составе фармацевтической композиции, которая включает частично нерастворимый ингибитор протеасомы, циклодекстрин и, необязательно, буфер. Такие фармацевтические композиции, как правило, включают фармацевтически эффективное количество ингибитора протеасомы, которое, например, облегчает проявления рака при введении пациенту.

В некоторых вариантах осуществления пептид эпоксикетон и другой терапевтический агент могут иметь одну и ту же форму (например, оба средства могут вводиться в форме таблеток или оба средства можно вводить внутривенно), тогда как в некоторых альтернативных вариантах осуществления пептид эпоксикетон и другой терапевтический агент могут иметь различные формы (например, одно средство можно вводить в форме таблеток, тогда как другое вводится внутривенно).

Точное время введения и/или количество композиции, которые позволят добиться наилучших результатов с точки зрения эффективности лечения данного пациента, будут зависеть от активности, фармакокинетики и биодоступности конкретного соединения, физиологического состояния пациента (включая его возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее физическое состояние, чувствительность к данной дозировке и тип медикаментозного лечения), пути введения и т.д. Однако приведенные выше указания можно использовать как основу для точного подбора лечения, например определения оптимального времени введения и/или количества вводимого препарата, что потребует проведения лишь рутинной экспериментальной работы, заключающейся в наблюдении за субъектом и подборе дозировки и/или времени введения.

Фраза "фармацевтически приемлемый" применяется в настоящем описании для обозначения таких лигандов, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые в рамках обоснованного суждения медицины подходят для применения в контакте с тканями людей и животных, не проявляя слишком сильного токсического действия, не вызывая раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, и соответствуют разумному соотношению польза/риск.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" в настоящей заявке означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, например жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и отсутствия вреда для пациента. Некоторые материалы, которые могут применяться в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, например лактозу, глюкозу и сахарозу; (2) крахмалы, например кукурузный крахмал, картофельный крахмал, и замещенный или незамещенный β -циклодекстрин; (3) целлюлозу и ее производные, например натрий карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) различные наполнители, например масло

какао и воски для суппозиториев; (9) различные масла, например арахисовое масло, масло хлопчатника, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, например пропиленгликоль; (11) полиолы, например глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, например этилолеат и этиллаурат; (13) агар-агар; (14) буферизирующие средства, например гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются апирогенными, т.е. не вызывают значительного повышения температуры при введении пациенту.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к сравнительно нетоксичным кислотно-аддитивным солям ингибиторов по настоящему изобретению, образованным органическими и неорганическими кислотами. Эти соли можно получать *in situ* при окончательном выделении и очистке ингибитора(ингибиторов) или в результате отдельной реакции очищенного ингибитора(ингибиторов) в форме свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой, с выделением полученной при этом соли. Типовые примеры солей включают гидробромиды, гидрохлориды, сульфаты, бисульфаты, фосфаты, нитраты, ацетаты, валераты, олеаты, пальмитаты, стеараты, лаураты, бензоаты, лактаты, фосфаты, тозилаты, цитраты, малеаты, fumarаты, сукцинаты, тартраты, нафтилалаты, мезилалаты, глюкогептонаты, лактобонаты, лаурилфосфонаты, соли аминокислот и т.п. (см., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

В других случаях ингибиторы, применимые в способах по настоящему изобретению, могут включать одну или несколько кислотных функциональных групп и, таким образом, способны образовывать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин "фармацевтически приемлемые соли" в этих случаях относится к сравнительно нетоксичным аддитивным солям ингибиторов по настоящему изобретению, образованным неорганическими и органическими основаниями. Эти соли аналогично можно получать *in situ* во время завершающего выделения и очистки ингибитора(ингибиторов) или в результате отдельной реакции очищенного ингибитора(ингибиторов) в форме свободной кислоты с подходящим основанием, например гидроксидом, карбонатом или бикарбонатом, или фармацевтически приемлемым катионом металла, с аммиаком или фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Типовые примеры солей щелочных или щелочно-земельных металлов включают соли лития, натрия, калия, кальция, магния, алюминия и т.п. Типовые примеры органических аминов, применимых для получения основно-аддитивных солей, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т.п. (см., например, Berge et al., выше).

Смачивающие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, например лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красящие средства, средства, способствующие высвобождению, вещества, образующие покрытия, подсластители, вкусоароматические средства и отдушки, консерванты и антиоксиданты, также могут входить в состав композиции.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, например аскорбиновую кислоту, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, например аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, α -токоферол и т.п.; и (3) агенты, образующие хелатные комплексы с металлами, например лимонную кислоту, этилендиамин тетрауксусную кислоту (ЭДТА), сорбит, винную кислоту, фосфорную кислоту и т.п.

Составы, подходящие для перорального введения, могут иметь форму капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, лекарственных леденцов (с применением ароматизированной основы, как правило, сахарозы, гуммиарабика или трагаканта), порошков, гранул или раствора или суспензии в водной или неводной жидкой среде, или жидких эмульсий масло-в-воде или вода-в-масле, или эликсира или сиропа, или пастилок (с применением инертной матрицы, например желатина и глицерина или сахарозы и гуммиарабика) и/или полоскания для рта и т.п., где каждая из перечисленных лекарственных форм содержит заранее определенное количество ингибитора(ингибиторов) по настоящему изобретению в качестве действующего ингредиента. Композицию можно вводить также в форме болуса, электуария или пасты.

В твердых дозированных формах для перорального введения (капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и т.п.) действующий ингредиент смешан с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, например цитратом натрия или дикальцийфосфатом и/или любым из следующих компонентов: (1) наполнителями или разбавителями, например крахмалами, циклодекстринами, лактозой, сахарозой, глюкозой, маннитом и/или кремниевой кислотой; (2) связующими веществами, например карбоксиметилцеллюлозой, альгинатами, желатином, поливинилпирролидоном, сахарозой и/или гуммиарабиком; (3) увлажнителями, например глицерином; (4) дезинтегрирующими средствами, например агар-агаром, карбонатом кальция, крахмалом картофеля или маниока, альгиновой кислотой, некоторыми силикатами и карбонатом натрия; (5) агентами, замедляющими растворение, такими как парафин; (6) ускорителями абсорбции, например четвертичными аммониевыми соединениями; (7) смачивающими агентами, например цетиловым спиртом или моностеаратом глицерина; (8) абсорбентами, например као-

лином и бентонитовой глиной; (9) смазывающими средствами, например тальком, стератом кальция, стеаратом магния, твердыми полиэтиленгликолями, лаурилсульфатом натрия и их смесями; и (10) красителями. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также включать буферизирующие средства. Твердые композиции подобного типа могут также применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, с использованием таких эксципиентов, как лактоза и молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетки можно изготавливать прессованием или формованием, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки можно получить, используя связующее вещество (например, желатин или гидроксипропилметилцеллюлозу), смазывающее средство, инертный разбавитель, консервант, дезинтегрирующее средство (например, крахмал гликолят натрия или поперечно-сшитую натрий карбоксиметилцеллюлозу), поверхностно-активное вещество или диспергирующее средство. Формованные таблетки можно изготовить путем формования в подходящем агрегате смеси порошкообразного ингибитора(ингибиторов), смоченных инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые дозированные формы, например драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут быть обязательно снабжены насечками или покрытиями и оболочками, например кишечными покрытиями и другими видами покрытий, хорошо известными в технике изготовления фармацевтических препаратов. Кроме того, упомянутым лекарственным формам можно придать такой состав, чтобы обеспечить медленное или регулируемое высвобождение входящего в них действующего ингредиента, например добавлением гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях, для обеспечения желаемого профиля высвобождения, а также применяя другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросферы. Препараты можно подвергнуть стерилизации, например, фильтрованием через фильтры, удерживающие бактерии, или введением стерилизующих агентов в форму твердых стерильных композиций, которые можно растворить в стерильной воде или некоторых других стерильных средах, подходящих для инъекций, непосредственно перед введением. Эти композиции могут также необязательно содержать средства для придания непрозрачности и могут иметь такой состав, чтобы высвободить действующий ингредиент(ингредиенты) только или преимущественно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно с задержкой. Примеры подходящих для применения композиций включают охватывают полимерные вещества и воски. В подходящих случаях действующий ингредиент может также находиться в микроинкапсулированной форме, вместе с одним или несколькими из описанных выше эксципиентов.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо действующего ингредиента, жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в технике, как, например, воду или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, например этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное масло, масло проростков, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и эфиры сорбитана и жирных кислот, а также смеси перечисленных веществ.

Помимо инертных разбавителей пероральные композиции могут также включать адъюванты, например смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, вкусоароматические добавки, красители, отдушки и консервирующие средства.

Кроме действующего ингибитора(ингибиторов) по настоящему изобретению суспензии могут содержать суспендирующие средства, например этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтилен сорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, включают один или несколько ингибиторов в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть превращены в стерильные растворы и дисперсии для инъекций непосредственно перед применением и могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворимые вещества, придающие составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, суспендирующие агенты или загустители.

Примеры подходящих водных или неводных носителей, которые могут применяться в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, например оливковое масло, и подходящие для инъекций органические эфиры, например этилолеат. В случае дисперсий необходимую текучесть можно поддерживать, например, применением покрывающих материалов, таких как, лецитин, за счет сохранения требуемого размера частиц, а также с помощью поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, например консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Прекращение деятельности микроорганизмов

можно обеспечить включением в состав различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Кроме того, может быть желательным ввести в композицию средства, регулирующие тоничность, например сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированной абсорбции инъекционной фармацевтической формы можно добиться включением в ее состав агентов, которые замедляют абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых случаях для продления действия лекарственного средства желательно замедлить его абсорбцию при подкожной или внутримышечной инъекции. Замедление абсорбции при парентеральном введении лекарственной формы достигается, например, растворением или суспендированием лекарственного средства в масляном носителе.

Предназначенные для инъекций формы пролонгированного действия получают микроинкапсулированием ингибитора(ингибиторов) в матрице из биоразрушаемых полимеров, например полилактида-полигликолида. В зависимости от относительного количества лекарственного средства и полимера, а также природы конкретного применяемого полимера можно регулировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразрушаемых полимеров включают поли(ортоэферы) и поли(ангидриды). Инъекционные составы пролонгированного действия получают также путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Фразы "парентеральное введение" и "введенный парентерально" в настоящем описании означают способ введения, отличный от энтерального и местного введения, обычно с помощью инъекции, и этот термин охватывает, не ограничиваясь перечисленным, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, внутрикожные, интраперитонеальные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, интраартикулярные, подкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные и интрастернальные инъекции и инфузии.

Фразы "системное введение", "введенный системно", "периферическое введение" и "введенный периферически" в настоящем описании означают введение лиганда, лекарственного средства или другого материала иначе, чем непосредственно в центральную нервную систему, с тем, чтобы указанный материал поступал в систему пациента и, следовательно, подвергался метаболизму и другим подобным процессам, например, приведенные фразы относятся к подкожному введению.

Введение пациенту терапевтических композиций по настоящему изобретению должно осуществляться в соответствии с общими протоколами введения химиотерапевтических средств, с учетом токсичности, в случае ее наличия. Предполагается, что при необходимости можно было бы повторить цикл лечения. Кроме того, имеется в виду, что различные стандартные способы лечения или вспомогательная противораковая терапия, а также хирургическое вмешательство, могут применяться в комбинации с описанным мышьяксодействующим средством.

Независимо от выбранного пути введения ингибитор(ингибиторы) по настоящему изобретению, который может применяться в виде соответствующим образом гидратированной формы, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают в состав фармацевтически приемлемых дозированных форм с применением стандартных методик, известных специалистам в данной области техники.

Фактическое содержание действующих ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно менять с тем, чтобы получить количество действующего ингредиента, композицию и форму введения, которые позволят добиться желаемой терапевтической реакции у данного пациента, но без токсического действия на его организм.

Помещенные ниже по тексту примеры приведены для более полной иллюстрации предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти примеры никоим образом не следует истолковывать, как ограничение объема изобретения, который определен приложенной формулой изобретения.

Применение соединений.

Упорядоченное разрушение белков имеет решающее значение для поддержания нормальной деятельности клетки, и протеасома участвует в процессе разрушения белка. Протеасома контролирует уровни белков, которые важны для развития клеточного цикла и апоптоза, в нормальных и злокачественных клетках; например циклинов, каспаз, BCL2 и nF-κB (Kumatori et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1990) 87: 7071-7075; Almond et al., Leukemia (2002) 16: 433-443). Поэтому неудивительно, что ингибирование активности протеасомы можно трансформировать в способ лечения различных болезненных состояний, например злокачественных, незлокачественных и аутоиммунных заболеваний, в зависимости от клеток, вовлеченных в развитие заболевания.

Химиотерапевтические средства и лекарственные средства, применяемые для лечения заболеваний, при которых целесообразно уничтожение аномальных клеток, например аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и ревматоидный артрит, а также рака. Хотя механизм действия каждой группы химиотерапевтических средств может отличаться, их действие, как правило, направлено на разрушение способности клеток к пролиферации.

Примеры

Пример 1.

У мышей с иммунной недостаточностью (BNX, Charles River Laboratories) вызывали развитие опухоли путем подкожного введения клеток человеческой лимфомы RL (1×10^7 /мышь) в правый бок в общем объеме 0,1 мл фосфатного буферного солевого раствора (PBS). Когда опухоли достигали размера примерно 50 мм^3 (что показано стрелкой на фиг. 1), мышей случайным образом разбивали по группам (9 мышей в группе). Соединение 1 вводили внутривенно (IV) в 10% растворе (мас./об.) сульфобутиловый эфир- β -циклодекстрина в водном 10 mM цитратном буфере pH 3,5. Введение осуществляли в 1 и 2 дни каждой недели. Препарат SAHA готовили в 100% ДМСО и вводили интраперитонеально (IP) в дни 1-5 каждой недели. *** $P < 0,001$ (соединение 1+SAHA по сравнению с носителем) по результатам двухфакторного ANOVA и апостериорных сравнений Бонферрони.

Пример 2.

Клеточные линии и реагенты: линии клеток лимфомы человека (RL), немелкоклеточной опухоли легких (A549) и опухоли кишечника (HT-29) приобретали у ATCC (Manassas, VA). Ингибитор HDAC - вориностат - приобретали у Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Доцетаксел приобретали у Sigma Chemicals (Ann Arbor, MI). Препарат Doxil приобретали в местной аптечной сети.

Исследование токсичности: самкам мышей BNX в возрасте 4-6 недель вводили химиотерапевтические средства различных классов в форме монотерапии или в комбинации с карфилзомибом. Двухнедельное исследование токсичности проводили с использованием дозировок и расписания введения, которые отражены в сопроводительной информации к соответствующим чертежам. Токсичность измеряли по потере массы тела три раза в неделю.

Исследования ксенотрансплантатов: развитие опухолей вызывали с помощью подкожной (s.c.) инъекции клеток указанных выше линий (во время имплантации количество пассажей < 9 и выживаемость $> 95\%$) в правый бок мышей BNX ($n=8/9$ на группу). В случае клеток RL вводили 0,1 мл клеточной суспензии, содержащей 1×10^7 клеток. В случае клеток HT-29, ES2 и A549 вводили 0,1 мл суспензии, содержащей 5×10^6 клеток. Мышей случайным образом разбивали на группы и начинали введение препаратов, когда размер опухоли достигал примерно 100 мм^3 . Во всех группах размеры опухолей измеряли трижды в неделю, регистрируя наибольшие перпендикулярные диаметры, и рассчитывали объемы опухолей, используя уравнение $V (\text{мм}^3) = (\text{длина} \times \text{ширина}^2) / 2$.

Статистический анализ: для сравнения результатов в различных группах проводили двухфакторный анализ ANOVA с последующим апостериорным анализом Бонферрони, используя программу GraphPad Prism (версия 4.01). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Соединение 1 в комбинации с доксилем показало хорошую переносимость при подходящей для клинического применения схеме введения, при MTD 10 мг/кг доксила \rightarrow Q7D (iv) и MTD 5 мг/кг карфилзомиба \rightarrow QD \times 2 (iv). Как показано на фиг. 2A, применялась схема введения доксил в день 1 (iv), через один час соединение 1 в дни 1, 2 (iv). Двухнедельное исследование токсичности проводили на мышах BNX ($n=5$) и определяли потерю массы тела, которая показана на фиг. 2B, где максимальная переносимая доза (MTD) доксила в качестве единственного лекарственного средства у мышей BNX составляла 20 мг/кг, в то время как MTD доксила в комбинации с соединением 1 (5 мг/кг) при изученной схеме введения составляла 10 мг/кг.

Потеря массы тела в %			
Доксил (iv) (2 недели)			
Комбинация	Дозировка	Схема введения	Потеря массы тела (%)
Нет	10 мг/кг	Q7D	10
Соединение 1 (5 мг/кг)	10 мг/кг	Q7D	16
Нет	20 мг/кг	Q7D	15

Соединение 1 в MTD (5 мг/кг) и доксил в суб-MTD дозировке (3 мг/кг) ($n=10$ в группе) на искусственно полученной модели ксенотрансплантата колоректального рака HT29 продемонстрировали повышенную противоопухолевую активность (комбинированная терапия *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем или индивидуальным введением карфилзомиба; ** $p < 0,01$ по сравнению с индивидуальным введением доксила), что показано на фиг. 3 (стрелки указывают на начало периода введения). Аналогичные результаты наблюдались для искусственно полученной модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких A549 (комбинированное введение *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем или индивидуальным введением доксила; статистическая значимость отсутствует по сравнению с индивидуальным введением карфилзомиба), что показано на фиг. 4 (стрелки указывают на начало периода введения).

Соединение 1 в комбинации с доцетакселом показало хорошую переносимость при подходящей для клинического применения схеме введения при MTD 10 мг/кг доцетаксела \rightarrow Q7D (iv) и MTD 5 мг/кг соединения 1 \rightarrow QD \times 2 (iv). Как показано на фиг. 5A, применялась схема введения доцетаксел в день 1 (iv),

через один час соединение 1 дни 1, 2 (iv). Затем проводили двухнедельное исследование токсичности на мышцах BNХ (n=5) и определяли потерю массы тела, причем МТD доцетаксела в комбинации с карфилзомибом при этой схеме введения составляла 10 мг/кг.

Потеря массы тела в %			
Доцетаксел (iv) (2 недели)			
Комбинация	Дозировка	Схема введения	Потеря массы тела (%)
Нет	10 мг/кг	Q7D	нет
Соединение 1	10 мг/кг	Q7D	16

Результаты для комбинации соединения 1 в МТD (5 мг/кг) и доцетаксела в суб-МТD дозировке (5 мг/кг) (n=10 в группе) на искусственно полученной модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких А549 (комбинированная терапия ***p<0,001 по сравнению с контролем; **p<0,05 по сравнению с индивидуальным введением карфилзомиба, NS по сравнению с доцетакселом) показаны на фиг. 6 (стрелки указывают на начало периода введения). Результаты для комбинации соединения 1 в суб-МТD дозировке (3 мг/кг) и доцетаксела в суб-МТD дозировке (5 мг/кг) (n=10 в группе) на искусственно полученной модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких А549 (комбинированная терапия ***p<0,001 по сравнению с контролем; **p<0,01 по сравнению с карфилзомибом и доцетакселом) показаны на фиг. 7 (стрелки указывают на начало периода введения).

Комбинация соединения 1 и вориностата показала хорошую переносимость при подходящей для клинического применения схеме введения, при 50 мг/кг→QD×5 вориностата (ip) и МТD 5 мг/кг соединения 1→QD×2 (iv). МТD вориностата не определяли. Вориностат вводили в дни 1-5 (ip), через один час соединения 1 в дни 1, 2 (iv), как показано на фиг. 8А. Токсичность при введении мышам BNХ соединения 1 и вориностата, определенная по потере массы тела, в исследованных группах оказалась близкой, и это дает возможность предположить, что такая комбинация хорошо переносилась экспериментальными животными (фиг. 8В).

Действие комбинации соединения 1 (3 мг/кг) и вориностата (50 мг/кг) (n=8 в группе) на искусственно полученные опухоли RL показано на фиг. 9 (стрелки указывают на начало периода введения). Действие комбинации соединения 1 (3 мг/кг) и вориностата (50 мг/кг) (n=8 в группе) на искусственно полученные опухоли ES2 (**P<0,01 и ***P<0,001 по сравнению с монотерапией и носителем) показано на фиг. 10 (стрелки указывают на начало периода введения).

Введение соединения 1 хорошо переносилось в комбинации с ингибитором гистон деацетилазы (вориностатом), средством для разрушения микротрубок (доцетакселом) и антрациклином (доксил) при клинически применимых схемах введения для каждого индивидуального средства. Комбинация соединения 1 и вориностата приводила к значительному ослаблению роста лимфомы (RL) по сравнению с контрольным введением носителя или индивидуальным введением любого из средств (p<0,001 относительно контроля; p<0,01 относительно индивидуального введения соединения 1 или вориностата). Комбинация соединения 1 и доцетаксела привела к значительному ослаблению роста опухоли А549 по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель, а также по сравнению с введением любого индивидуального средства (p<0,001 по отношению к контролю; p<0,01 по отношению к индивидуальному введению карфилзомиба или доцетаксела). Аналогичные результаты наблюдались в модели ксенотрансплантата НТ-29, где комбинация соединения 1 и доксила значительно уменьшает опухолевую нагрузку (p<0,001 относительно контроля или индивидуального введения карфилзомиба; p<0,01 относительно индивидуального введения доксила). Соединение 1 и доксил в суб-МТD дозировках демонстрируют синергетическое противоопухолевое действие в модели солидной опухоли. Аналогично, соединение 1 в комбинации с доцетакселом в суб-МТD дозах позволяет добиться синергетического противоопухолевого действия в модели рака легких человека. Соединение 1 в комбинации с вориностатом вызывает синергетический противоопухолевый эффект в модели лимфомы. Соединение 1 в комбинации с вориностатом проявляет эффективные противоопухолевые свойства в модели рака яичников.

Пример 3.

Соединение 1 тестировали при концентрации 6,58 нМ в комбинации с мелфаланом в четырех различных дозировках: 11,1, 7,4, 4,9 и 3,3 мкМ. Клетки MM1.S (множественной миеломы, восприимчивые к дексаметазону) помещали в планшеты в количестве 200000 клеток/мл в объеме 45 мкл и затем предварительно обрабатывали мелфаланом в течение 24 ч. Затем добавляли соединение 1 и клетки инкубировали в течение дополнительных 24 ч при концентрации 6,58 нМ. Затем к образцам клеток добавляли раствор глиоксалазы для клеточного титрования в соотношении 1:1 и осуществляли считывание для определения выживаемости. Рассчитывали значения комбинационных коэффициентов, используя программу Calcsyn, причем значения <0,9 соответствовали синергии, 0,9-1,0 соответствовали аддитивности и значения >1,1 - антагонизму. Полученные результаты показали, что соединение 1 и мелфалан проявляли синергическое и аддитивное действие при указанных концентрациях, что показано на фиг. 11.

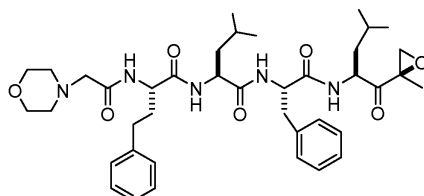
Эквиваленты.

Специалисты в данной области поймут или будут способны установить с помощью не более чем обычного объема экспериментальной работы многочисленные эквиваленты соединений и способов их применения, описанных в настоящей заявке. Считается, что эти эквиваленты входят в объем настоящего изобретения и охвачены следующей далее по тексту формулой изобретения.

Все упомянутые выше литературные источники и публикации включены в настоящую заявку посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения множественной миеломы, включающий введение пациенту комбинации, содержащей: (1) ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу



или его фармацевтически приемлемую соль, (2) леналидомид и (3) дексаметазон, где указанная комбинация ингибитора пептид эпоксикетон, леналидомида и дексаметазона демонстрирует эффективность, превосходящую эффективность любого из упомянутых средств при их индивидуальном введении.

2. Способ по п.1, где леналидомид вводят пациенту в дозе, составляющей по меньшей мере 15 мг/м².

3. Способ по п.1, где леналидомид вводят пациенту в дозе, составляющей по меньшей мере 20 мг/м².

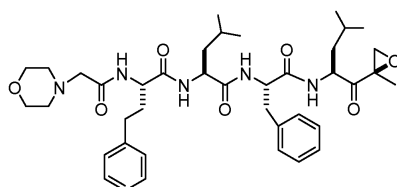
4. Способ по п.1, где ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, и леналидомид вводят одновременно.

5. Способ по п.1, где леналидомид вводят в течение от примерно 5 мин до примерно 48 ч до или после введения ингибитора протеасомы, представляющего собой пептид эпоксикетон.

6. Способ по п.1, где множественная миелома представляет собой рецидивирующую множественную миелому.

7. Способ по п.1, где ингибитор пептид эпоксикетон вводят пациенту в дозе, составляющей по меньшей мере 15 мг/м².

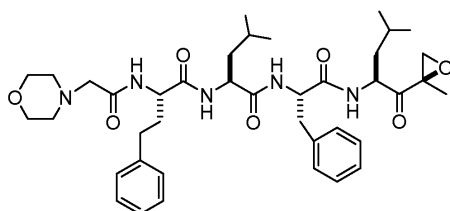
8. Применение ингибитора протеасомы, представляющего собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу



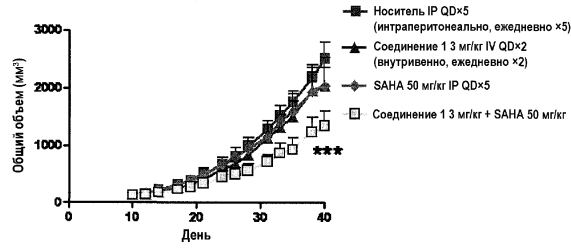
или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с леналидомидом и дексаметазоном для лечения множественной миеломы, где указанная комбинация ингибитора пептид эпоксикетон, леналидомида и дексаметазона демонстрирует эффективность, превосходящую эффективность любого из упомянутых средств при их индивидуальном введении.

9. Применение по п.8, где множественная миелома представляет собой рецидивирующую множественную миелому.

10. Способ лечения рецидивирующей множественной миеломы, включающий введение пациенту комбинации, содержащей: (1) ингибитор протеасомы, представляющий собой пептид эпоксикетон, имеющий формулу

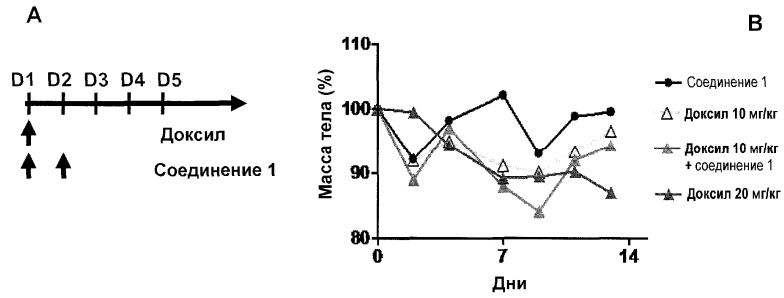


или его фармацевтически приемлемую соль, (2) леналидомид и (3) дексаметазон.

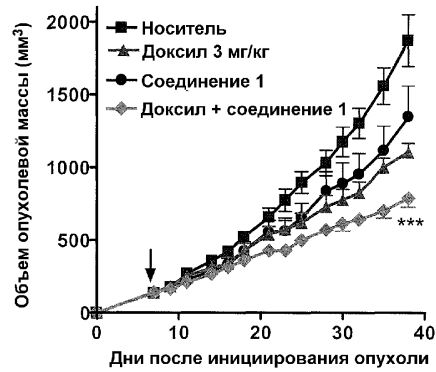


p < 0,001 по сравнению с контролем n=9

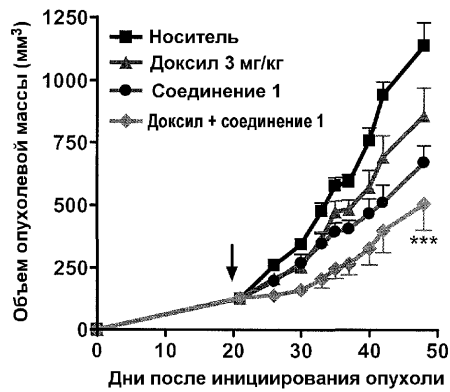
Фиг. 1



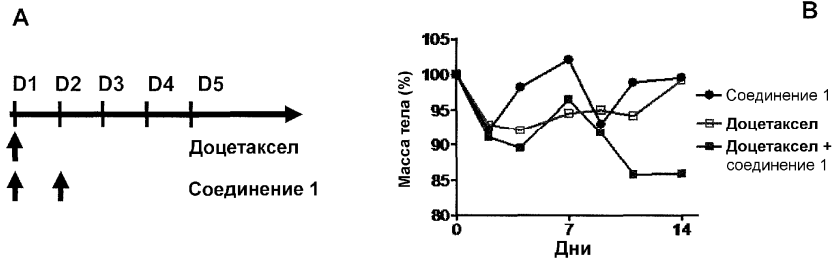
Фиг. 2



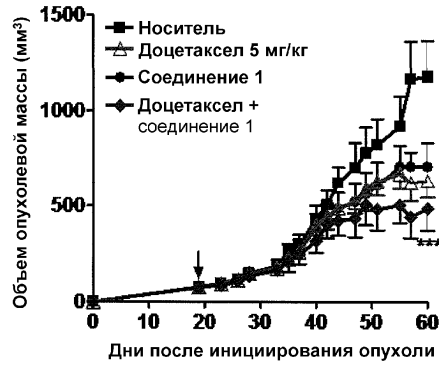
Фиг. 3



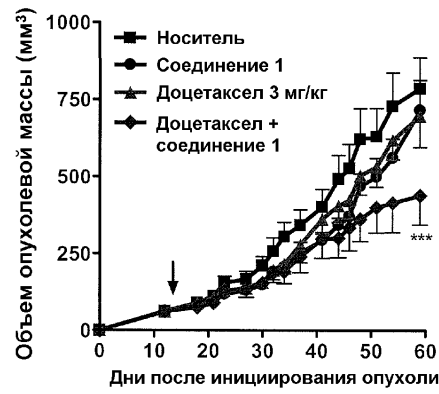
Фиг. 4



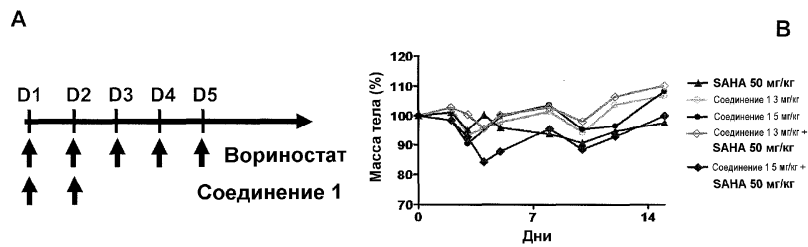
Фиг. 5



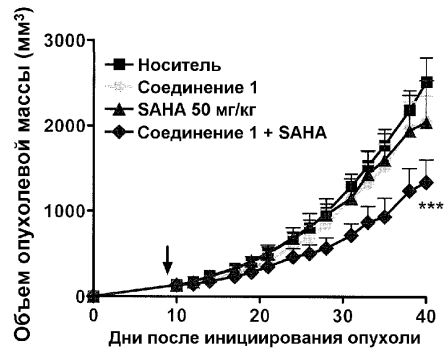
Фиг. 6



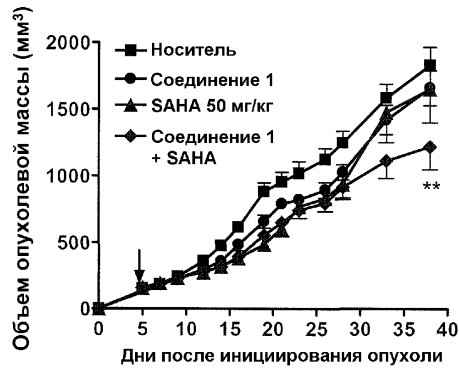
Фиг. 7



Фиг. 8

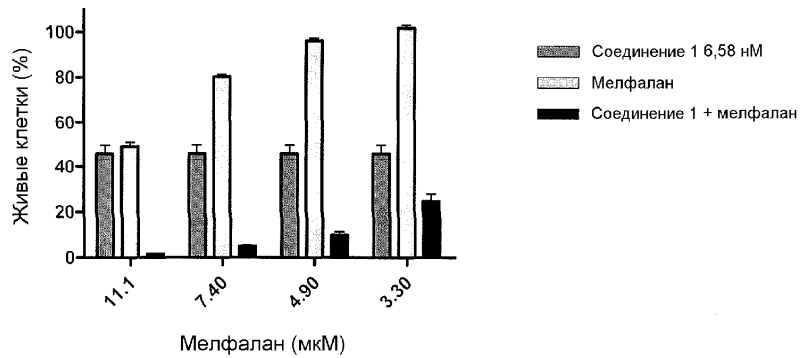


Фиг. 9



Фиг. 10

Клетки MM1.S - соединение 1 (6,58 нМ) и мелфалан

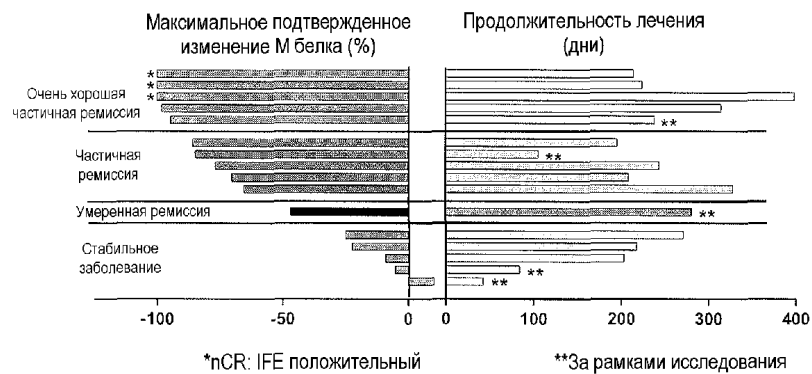


Фиг. 11

Λ.

Группа	Карфилзомиб/леналидомид мг/м ² /мг	N	Очень хорошая частичная ремиссия	Частичная ремиссия	Умеренная ремиссия	Стабильное заболевание	Прогрессирование заболевания
1	15 / 10	6	2	1		2	1
2	15 / 15	4	1	1	1	1	
3	15 / 20	7	2	3		2	

В.



Фиг. 12

