

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037057**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.01.29

(21) Номер заявки

201692472

(22) Дата подачи заявки

2015.03.26

(51) Int. Cl. *A61K 31/395* (2006.01)*A61K 31/4184* (2006.01)*A61K 31/502* (2006.01)*A61K 31/55* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61P 35/04* (2006.01)

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОЕДИНЕНИЯ С
ДВОЙНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬЮ АЛКИЛИРОВАНИЯ-ИНГИБИРОВАНИЯ
HDAC**

(31) 1409471.8

(32) 2014.05.28

(33) GB

(43) 2017.05.31

(86) PCT/EP2015/056667

(87) WO 2015/180865 2015.12.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭРО-СЕЛТИК С.А. (LU)

(72) Изобретатель:

Мерлинг Томас (CH), Фестучча
Клаудио (IT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2013113838

WO-A2-2010085377

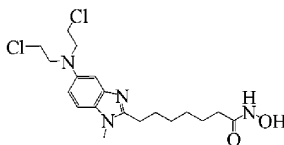
WO-A2-2013040286

DATABASE MEDLINE [Online] US
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM),
BETHESDA, MD, US; May 2014 (2014-05), WANG
XIAO-RONG ET AL.: "[Effect of histone deacetylase
inhibitor NL101 on rat neurons]", XP002740556,
Database accession no. NLM24998648, abstract
& ZHEJIANG D.A. XUE XUE BAO. YI XUE
BAN = JOURNAL OF ZHEJIANG UNIVERSITY.
MEDICAL SCIENCES MAY 2014, vol. 43, no.
3, May 2014 (2014-05), pages 265-272, ISSN:
1008-9292

ZULKOWSKI K. ET AL.: "Regression of
Brain Metastases from Breast Carcinoma after
Chemotherapy with Bendamustine", JOURNAL
OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL
ONCOLOGY, SPRINGER INTERNATIONAL,
BERLIN, DE, vol. 128, 1 January 2002
(2002-01-01), pages 111-113, XP003005594, ISSN:
0171-5216, DOI:10.1007/S00432-001-0303-4, the
whole document

CHAMBERLAIN MARC C.: "Salvage therapy
with bendamustine for methotrexate refractory
recurrent primary CNS lymphoma: a retrospective
case series", JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY
MAY 2014, vol. 118, no. 1, May 2014 (2014-05),
pages 155-162, XP002740557, ISSN: 1573-7373, the
whole document

(57) В изобретении предложены способы лечения рака головного мозга, выбранного из MGMT-позитивной астроцитарной опухоли головного мозга, метастатического рака головного мозга и первичной лимфомы ЦНС, а также MGMT-позитивной мультиформной глиобластомы, у нуждающегося в этом больного, включающие введение указанному больному соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли



I.

B1**037057****037057 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым способам лечения рака головного мозга, который особенно устойчив к лечению, применяемому в прошлом, а именно к способам лечения MGMT-позитивных астроцитарных опухолей головного мозга, типов рака мозга, которые представляют собой типы метастатического рака и типы первичной лимфомы ЦНС, а также MGMT-позитивной мультиформной глиобластомы.

Уровень техники

Рак является одним из самых опасных для жизни заболеваний. Рак представляет собой состояние, при котором в определенной части тела происходит неконтролируемый рост клеток. Согласно последним данным Американского общества рака в США в 2014 г. выявлено 1,67 млн новых случаев рака. Рак является второй ведущей причиной смерти в Соединенных Штатах (второй только относительно заболеваний сердца), и, как подсчитано, унес более 585000 жизней в 2014 г. Фактически подсчитано, что у 50% всех мужчин и 33% всех женщин, живущих в Соединенных Штатах, будет развиваться какой-то тип рака в течение их жизни. Поэтому рак является серьезным бременем для общественного здравоохранения и связан со значительными расходами в Соединенных Штатах. Эти данные отражают ситуацию в большинстве остальных стран по всему миру, хотя типы рака и относительные соотношения людей, у которых развиваются разные типы рака, варьируются в зависимости от множества различных факторов, например, включая генетику и рацион питания.

Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) классифицирует первичные опухоли головного мозга в виде четырех категорий. Класс I и II ВОЗ представляют собой высокодифференцированные глиомы, в то время как астроцитомы и олигодендроглиомы (класс III ВОЗ), а также глиобластомы (GBMs) (класс IV ВОЗ) в совокупности обозначаются как злокачественные глиомы. Прогноз большинства первичных и вторичных опухолей головного мозга неблагоприятный из-за недостатка эффективных терапевтических агентов. Они являются основной причиной смерти от солидных опухолей у детей и третьей ведущей причиной смерти от рака у подростков и взрослых в возрасте 15-34 лет (Jemal et al., *CA Cancer J Clin*, 59, 2009, 225-249).

Среди злокачественных глиом GBMs являются наиболее распространенными и фатальными новообразованиями, составляя приблизительно 50% всех глиом. GBM имеет неутешительный прогноз, что свидетельствует о необходимости новых стратегий лечения. Хирургическое вмешательство с последующим сочетанным лечением алкилирующим агентом темозоломидом (TMZ) и лучевой терапией является стандартным лечением больных, страдающих GBM. Основной механизм действия TMZ инициируется аномальным метилированием оснований ДНК, особенно Об-метилгуанина в ДНК (Verbeek et al., *Br Med Bul*, 85, 2008, 17-33). Однако многие больные устойчивы или дают только слабую реакцию на TMZ. Это, как показано, возникает в результате ошибочной репарации (MMR), опосредуемой Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазой (MGMT) (смотри Weller et al., *Nat Rev Neurol*, 6, 2010, 39-51). Больные, имеющие такую систему репарации, страдают "MGMT-позитивными GBMs". Активация путей mTOR/DNAРКC так же, как полагают, играет определенную роль. До настоящего времени не разработаны химиотерапевтические агенты, которые являются активными против MGMT-позитивных GBMs. Активность MGMT также имеет большое значение при других астроцитарных опухолях головного мозга, а именно диффузных астроцитомах (класс III ВОЗ) и анапластических астроцитомах (класс III ВОЗ). Прогрессия их до GBMs опосредуется главным образом путем метилирования с помощью MGMT. Таким образом, можно видеть, что терапевтический агент, который активен против MGMT-позитивных астроцитов, будет желательным для предотвращения прогрессии этих диффузных и анапластических астроцитов до GBMs.

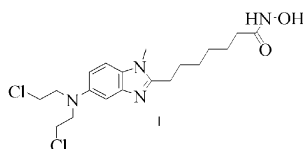
Поэтому крайне важно срочно разработать новый терапевтический агент с отличной противоопухолевой активностью не только в отношении MGMT-негативных GBMs, но и в отношении MGMT-позитивных GBMs (а также других астроцитарных опухолей головного мозга), который характеризуется превосходным проникновением в ЦНС и имеет допустимый профиль токсичности.

Метастатическая опухоль мозга начинается как рак в других местах организма и распространяется в мозг. Рак молочной железы, легких, меланома, рак толстой кишки и почек обычно метастазирует. Часто метастатическая опухоль головного мозга обнаруживается до первичной опухоли. Метастатические опухоли головного мозга являются наиболее распространенными среди всех опухолей головного мозга у взрослых. Подсчитано, что они могут достигать до 170000 новых случаев каждый год. Хотя прогноз немного лучше, чем у GBMs, прогноз метастатического рака головного мозга обычно является плохим. Вновь применяется сочетание хирургического вмешательства, терапии и химиотерапии с точным сочетанием в пределах этих вариантов в зависимости от природы метастатического рака и стадии развития (а также от состояния здоровья больного). Хирургическое вмешательство (когда это возможно) и лучевая терапия представляют собой стандартное применяемое лечение. Иногда используется химиотерапия. К сожалению, ничего из этого на сегодняшний день не было особенно успешным. Частично это происходит из-за потребности в химиотерапевтическом агенте, характеризующимся превосходным проникновением в ЦНС (а также, конечно, и превосходной противоопухолевой активностью и профилем переносимой токсичности). Многие существующие химиотерапевтические агенты демонстрируют плохое про-

никновение через гематоэнцефалический барьер. Существует острая потребность в новом терапевтическом агенте для решения этих проблем.

Первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС) берет начало из лимфоцитов, но должна рассматриваться как опухоль головного мозга из-за ее локализации исключительно в мозге и терапевтических проблем, сходных с проблемами для других опухолей головного мозга. В частности, доставка лекарственных средств нарушается из-за гематоэнцефалического барьера, и токсичность для головного мозга ограничивает использование современных методов лечения. Большинство первичных лимфом ЦНС представляет собой диффузные В-клеточные лимфомы (приблизительно 90%). Несмотря на то что они относительно редки, их частота и распространенность увеличивается. В настоящее время медиана показателя выживаемости при существующих схемах лечения составляет 44 месяца. Для этого состояния до сих пор не существует никакой особенно эффективной схемы лечения. В настоящее время предпочтительный химиотерапевтический агент представляет собой метотрексат. Однако его проникновение через гематоэнцефалический барьер является неудовлетворительным, и он должен быть введен в очень высоких дозах. Совместное с лучевой терапией лечение может улучшить результаты, но побочные эффекты могут быть очень серьезными. Существует, следовательно, потребность в улучшенном химиотерапевтическом агенте, который обладает большей способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, а также показывает превосходную противоопухолевую активность против первичных лимфом ЦНС.

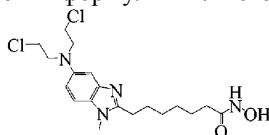
В патенте WO-A-2010/085377 раскрывается соединение формулы I, представленное ниже. Это первая в своем классе гибридная молекула с двойной функциональностью алкилирования-HDACi, которая существенно ингибирует путь HDAC.



Биологические испытания показали, что соединение формулы I эффективно ингибирует ферменты HDAC класса 1 и класса 2 (например, HDAC1 с IC_{50} 9 нМ), и, как показано, обладает превосходной активностью *in vitro* в отношении многих клеточных линий миеломы. Кроме того, оно подавляет репарацию ДНК с помощью значительной негативной регуляции FANCD2, BRCA1, BRCA2 и TS (тимидилатсинтетазы), что возможно связано с ингибированием HDAC6 и HDAC8. Анализ на цитотоксичность в клеточных линиях NCI-60 показал, что оно обладает очень сильным противоопухолевым действием с медианой величины IC_{50} 2,2 мкМ по сравнению с 72 мкМ для бендамустина. В патент WO-A-2013/113838 включены данные, которые демонстрирует активность соединения формулы I (обозначаемого в описании как NL-101) против ряда клеточных линий, включая некоторые клеточные линии глиобластомы. Однако неясно, является ли каждая из этих клеточных линий MGMT-негативной клеточной линией опухоли GBM.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения рака головного мозга, выбранного из MGMT-позитивной астроцитарной опухоли головного мозга, метастатического рака головного мозга и первичной лимфомы ЦНС, у нуждающегося в этом больного, включающий введение указанному больному соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли



I.

В доклинических исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что соединение формулы I активно не только в отношении MGMT-негативных опухолей GBM, но и в отношении MGMT-позитивных опухолей GBM. Исходя из этого, можно также ожидать, что оно будет активно в отношении других MGMT-позитивных астроцитарных опухолей. Кроме того, было обнаружено, что соединение формулы I способно очень хорошо проникать через гематоэнцефалический барьер, что делает его идеальным для терапевтического применения не только против MGMT-позитивных астроцитарных опухолей, но и против других опухолей мозга. В частности, дополнительно было обнаружено, что оно обладает очень хорошей активностью в отношении метастатического рака головного мозга, а также первичной лимфомы ЦНС.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения MGMT-позитивной мультиформной глиобластомы у нуждающегося в этом больного, включающий введение указанному больному соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли.

Описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график зависимости концентрации EDO-S101 (мкМ) от времени в спинномозговой жидкости и от времени в крови;

фиг. 2 представляет собой диаграмму IC_{50} для двенадцати тестируемых клеточных линий GBM после введения темозоломида;

фиг. 3 представляет собой диаграмму IC_{50} для двенадцати тестируемых клеточных линий GBM после введения темозоломида и вориностата;

фиг. 4 представляет собой диаграмму IC_{50} для двенадцати тестируемых клеточных линий GBM после введения бендамустина;

фиг. 5 представляет собой диаграмму IC_{50} для двенадцати тестируемых клеточных линий GBM после введения бендамустина и вориностата;

на фиг. 6 представлена диаграмма процента выживаемости клеток в зависимости от концентрации EDO-S101 (мкМ) для каждой из двенадцати тестируемых клеточных линий;

на фиг. 7а представлен график зависимости люминесценции от времени в качестве меры роста клеток GBM12 после введения;

на фиг. 7b представлен график зависимости процента выживаемости от времени, демонстрирующий пролонгирование выживаемости в случае EDO-S101 по сравнению с бендамустином и контролем;

на фиг. 8 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей, несущих имплантированные опухоли U251, которых лечили EDO-S101;

на фиг. 9 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей, несущих имплантированные опухоли U87, которых лечили EDO-S101;

на фиг. 10 представлен график зависимости доли выживающих от дозы лучевой терапии (Гр) для клеток U251, U87 и T98G, подвергавшихся только лучевой терапии, лучевой терапии и 2,5 мкМ EDO-S101 (показано на чертеже как NL-101) и 5 мкМ EDO-S101 EDO-S101;

на фиг. 11 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей, несущих имплантированные опухоли U251, которых лечили контрольным воздействием, лучевой терапией и EDO-S101;

на фиг. 12 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей, несущих имплантированные опухоли U251, которых лечили контрольным воздействием, лучевой терапией и темозоломидом, EDO-S101 и лучевой терапией, и EDO-S101;

на фиг. 13 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей, несущих имплантированные опухоли U87, которых лечили контрольным воздействием, лучевой терапией и EDO-S101;

на фиг. 14 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей, несущих имплантированные опухоли U87, которых лечили контрольным воздействием, лучевой терапией и темозоломидом, EDO-S101 и лучевой терапией, и EDO-S101;

фиг. 15 и 16 представляют собой биолюминесцентные изображения мышей с ортотопической трансплантацией линии U251 GBM с трансфецированной люциферазой после лечения носителем, EDO-S101, темозоломидом и лучевой терапией, и темозоломидом;

на фиг. 17 представлен график зависимости вероятного времени до прогрессии (ТТР) (%) от времени для мышей с ортотопической трансплантацией линии U251 с трансфецированной люциферазой после лечения носителем, EDO-S101, темозоломидом и лучевой терапией, и темозоломидом;

на фиг. 18 представлен график зависимости процента выживаемости от времени для мышей, несущих имплантированные лимфомы ЦНС OCI-LY10, которых лечили контрольным воздействием, бендамустином и EDO-S101;

на фиг. 19 представлен график зависимости процента выживаемости от времени для мышей, несущих тройной негативный рак молочной железы с метастазами в мозг после трансфекции клеток MB-468 рака молочной железы, которых лечили контрольным воздействием, бендамустином и EDO-S101.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении используется ряд общих терминов и выражений, которые следует интерпретировать следующим образом.

Астроцитарная опухоль головного мозга представляет собой опухоль, происходящую из звездчатых клеток глии (астроцитов) в головном мозге. Они делятся на высокодифференцированные (класс I и II) и низкодифференцированные (класс III и IV). Астроцитарные опухоли класса II известны как диффузные астроцитомы. Хотя они растут сравнительно медленно, они могут переродиться в злокачественные первичные опухоли. Астроцитарные опухоли класса III известны как анапластические астроцитомы. Они представляют собой злокачественные опухоли; они растут более быстрыми темпами и стремятся к инвазии в близлежащие здоровые ткани. Астроцитарные опухоли класса IV известны как мультиформные глиобластомы (GBM). Они являются крайне злокачественными, быстро растут, легко распространяются в близлежащие ткани и очень трудно поддаются лечению традиционными методами.

Текущим стандартом химиотерапевтического лечения является темозоломид (TMZ). Однако многие больные резистентны или лишь слабо реагируют на него. Это, как показано, возникает в результате оши-

бочной репарации (MMR), опосредуемой Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазой (MGMT) (смотри Weller et al., Nat Rev Neurol, 6, 2010, 39-51). Больные, имеющие такую систему репарации, страдают "MGMT-позитивными GBMs". GBMs, таким образом, делятся на MGMT-негативные GBMs и MGMT-позитивные GBMs в зависимости от того, экспрессируют ли они ген MGMT. Соединения формулы I по настоящему изобретению или их фармакологически приемлемая соль, как показано, активны не только против MGMT-негативных GBMs, но и против MGMT-позитивных GBMs.

Активность MGMT также важна при других астроцитарных опухолях головного мозга, а именно диффузных астроцитомах (класс II ВОЗ) и анапластических астроцитомах (класс III ВОЗ). Их прогрессия до GBMs опосредуется главным образом путем метилирования с помощью MGMT. Таким образом, можно отметить, что, так как соединение формулы I и его фармакологически приемлемые соли активны против MGMT-позитивных астроцитов, они также будут способны предотвращать прогрессию этих диффузных и анапластических астроцитов до GBMs.

Метастатическая опухоль головного мозга представляет собой опухоль головного мозга, которая начинается как рак в любых других частях тела и распространяется на мозг. Рак молочной железы, легких, меланомы, системная лимфома, саркома, рак толстой кишки, желудочно-кишечного тракта и почек обычно метастазируют.

Первичная лимфома ЦНС в контексте настоящего изобретения представляет собой лимфому, которая возникает в головном мозге из лимфоцитов, причем злокачественные клетки образуются из указанных лимфоцитов. Она, следовательно, рассматривается как опухоль головного мозга, поскольку ее локализация и терапевтические проблемы сходны с другими опухолями головного мозга.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" означает соли соединений по настоящему изобретению, которые являются фармацевтически приемлемыми, как определено выше, и которые обладают желаемой фармакологической активностью. Такие соли включают аддитивные соли кислот, образованные с неорганическими кислотами или с органическими кислотами. Фармацевтически приемлемые соли также включают аддитивные соли оснований, которые могут быть образованы, когда присутствующие протоны кислоты способны взаимодействовать с неорганическими или органическими основаниями. Как правило, такие соли получают, например, взаимодействием форм свободной кислоты или основания этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в смеси их двух. Обычно предпочтительными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Примеры аддитивных солей кислоты включают аддитивные соли неорганических кислот, такие как, например, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, бисульфат, сульфамат, нитрат, фосфат, и аддитивные соли органических кислот, такие как, например, ацетат, трифторацетат, малеат, фумарат, цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, салицилат, тозилат, лактат, нафталинсульфонат, малат, манделат, метансульфонат и п-толуолсульфонат. Примеры аддитивных солей основания включают неорганические соли, такие как, например, соли натрия, калия, кальция и аммония, а также соли органических оснований, такие как, например, этилендиамин, этаноламин, N,N-диалкиленэтанолламин, триэтанолламин и соли основных аминокислот.

В настоящем изобретении фармакологически приемлемая соль соединения формулы I может предпочтительно представлять собой гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, бисульфат, сульфамат, нитрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, салицилат, лактат, нафталинсульфонат или ацетат и более предпочтительно ацетат.

В настоящем изобретении, когда соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль применяется в способе лечения MGMT-позитивной астроцитарной опухоли головного мозга, ее предпочтительно выбирают из MGMT-позитивной мультиформной глиобластомы, диффузной астроцитомы (класс II ВОЗ) и анапластической астроцитомы (класс III ВОЗ), и наиболее предпочтительно из MGMT-позитивной мультиформной глиобластомы.

В настоящем изобретении, когда соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль применяется в способе лечения метастатического рака головного мозга, его предпочтительно выбирают из метастатического рака молочной железы, метастатической системной лимфомы, метастатического рака легкого, метастатической меланомы, метастатической саркомы и метастатического рака желудочно-кишечного тракта, и наиболее предпочтительно из метастатического рака молочной железы.

Терапевтически эффективное количество соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли, вводимое больному в соответствии с первым и вторым аспектами настоящего изобретения, представляет собой количество, которое дает терапевтический эффект в соответствии с настоящим изобретением у получающего лечение индивидуума при разумном соотношении пользы/риска, пригодном при любом медикаментозном лечении. Терапевтический эффект может быть объективным (т.е. измеряемым неким тестом или маркером) или субъективным (т.е. индивидуум свидетельствует о симптоме или чувствует эффект). Эффективное количество соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли по настоящему изобретению, как считается, представляет собой количество, в котором соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль входит в диапазон дозирования от 0,1 до 70 мг/кг массы тела больного (например, от 0,5 до 50 мг/кг массы тела, например 1, 5, 10, 20, 30, 40

или 50 мг/кг массы тела).

Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного больного будет зависеть от множества факторов, включая нарушение, подлежащее лечению, и тяжесть заболевания; активность конкретного используемого соединения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания больного; время введения, путь введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в сочетании или одновременно с конкретным используемым соединением; и дополнительные факторы, хорошо известные в области медицины.

Подходящие примеры формы введения соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли в соответствии с первым и вторым аспектами настоящего изобретения, включают без ограничений пероральный, местный, парентеральный, сублингвальный, ректальный, вагинальный, окулярный и интраназальный путь. Парентеральное введение включает методы подкожной инъекции, внутривенной, внутримышечной, интратеральной инъекции или инфузии. Предпочтительно соединение формулы (I) или его фармакологически приемлемую соль вводят парентерально и наиболее предпочтительно внутривенно.

Предпочтительно соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль вводят нуждающемуся в этом больному внутривенно при уровне дозы для нуждающегося в этом больного от 0,1 до 70 мг/кг массы тела больного и наиболее предпочтительно внутривенно нуждающемуся в этом больному при уровне дозы от 0,5 до 50 мг/кг массы тела больного.

Было обнаружено, что в первом и втором аспектах настоящего изобретения соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль может быть предпочтительно введено в организм нуждающегося в этом больного на 1, 8 и 15 день цикла лечения, на 1 и 8 день цикла лечения или только на 1 день цикла лечения.

В другом предпочтительном варианте осуществления первого и второго аспектов настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что соединение формулы I и его фармакологически приемлемые соли являются значительно более эффективными при введении в сочетании с лучевой терапией, и действительно, как представляется, действуют синергически с лучевой терапией в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Как следствие, в первом и втором аспектах настоящего изобретения соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль может быть использовано при лечении нуждающегося в этом больного, где нуждающийся в этом больной также получает лучевую терапию либо до, либо после лечения рака головного мозга с помощью соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли. Предпочтительно, чтобы больной получал лечение лучевой терапией перед лечением с помощью соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли. Лучевая терапия может быть дана в дозе от 1 до 5 Гр в течение 5 последовательных дней, и предпочтительно 2 Гр в течение 5 последовательных дней.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления первого и второго аспектов настоящего изобретения лечение дополнительно включает введение нуждающемуся в этом больному ингибитора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли, и ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) можно вводить одновременно, последовательно или раздельно, и предпочтительно одновременно. Предпочтительно ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой бевацизумаб.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления первого и второго вариантов осуществления настоящего изобретения лечение дополнительно включает введение нуждающемуся в этом больному ингибитора поли-(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) и соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли, и ингибитор поли-(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) можно вводить одновременно, последовательно или раздельно, и предпочтительно одновременно. Предпочтительно ингибитор поли-(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) выбран из рукапариба, олапариба и велипариба.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления первого и второго вариантов осуществления настоящего изобретения лечение дополнительно включает введение нуждающемуся в этом больному ингибитора PD-1/PDL-1 (иммунной контрольной точки) и соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли, и ингибитор PD-1/PDL-1 (иммунной контрольной точки) можно вводить одновременно, последовательно или раздельно, и предпочтительно одновременно. Предпочтительно ингибитор PD-1/PDL-1 (иммунной контрольной точки) представляет собой ипилимумаб.

При использовании для перорального введения соединения формулы I или его фармакологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения могут быть в твердой или жидкой форме, где полутвердая, полужидкая суспензии и гелевые формы включены в пределы форм, рассматриваемых в данном документе в качестве твердых или жидких.

Соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения могут быть получены для введения с использованием метода, хорошо известного в области фармацевтики. Примеры подходящих фармацевтических композиций и носителей описаны E.W. Martin в "Remington's Pharmaceutical Sciences".

В качестве твердой композиции для перорального введения соединения формулы I или его фарма-

кологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения могут быть составлены в виде порошка, гранул, прессованных таблеток, драже, капсул, жевательной резинки, пластины или тому подобных форм. Такая твердая композиция обычно содержит один или более инертных разбавителей, либо в виде единой таблетки, содержащей все активные агенты, либо в виде ряда отдельных твердых композиций, причем каждая из которых включает один активный агент из сочетания по настоящему изобретению (в случае набора).

Кроме того, может присутствовать одно или более из следующего: связующие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза или желатин; наполнители, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхлители, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, кукурузный крахмал и тому подобное; смазывающие агенты, такие как стеарат магния; глиданты, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизирующий агент, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор и окрашивающий агент.

Когда соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения находятся в форме капсулы (например, желатиновой капсулы), она может содержать, в дополнение к веществам указанного выше типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль, циклодекстрин или жирное масло.

Соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения могут быть в виде жидкости, например в виде эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть полезна для перорального введения или для доставки путем инъекции. При использовании для перорального введения соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения может включать одно или более из подсластителя, консервантов, красителя/окрашивающего агента и усилителя вкусоароматических свойств. В соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения для введения путем инъекции может быть также включено одно или более из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

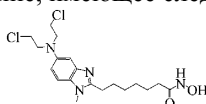
Предпочтительным путем введения является парентеральное введение, включая, но, не ограничиваясь этим, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, интраназальное, эпидуральное, интраназальное, внутричерепное, внутрижелудочковое, интратекальное, интравагинальное или трансдермальное введение. Предпочтительный путь введения остается на усмотрение практикующего врача, и должен частично зависеть от локализации патологического нарушения (например, локализации рака). В более предпочтительном варианте осуществления соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения вводят внутривенно.

Жидкое соединение формулы I или его фармакологически приемлемая соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения, является ли оно раствором, суспензией или другой аналогичной формой, также может включать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, полиэтиленгликоли, глицерин или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; и агенты для доведения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральные сочетания или композиции могут быть заключены в ампулу, одноразовый шприц или флакон для множественных доз, сделанный из стекла, пластика или другого материала. Физиологический солевой раствор является предпочтительным адьювантом.

Соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль согласно первому и второму аспектам настоящего изобретения можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную или кожно-слизистую выстилку и предпочтительно путем болюсного введения.

Примеры

В следующих примерах соединение, имеющее следующую формулу I, обозначается как



I

EDO-S101.

EDO-S101 получали, как описано в примере 6 патента WO-A-2010/085377. EDO-S101 растворяли в ДМСО (100× маточного раствора) и хранили при 4°C до суспендирования в среде в день использования.

Пример 1. Фармакокинетический анализ поступления EDO-S101 в ЦНС у крыс Sprague-Dawley.

Фармакокинетику в ЦНС определяли у крыс после инъекции EDO-S101 в дозе 40 мг/кг в хвостовую

вену. Образцы микродиализатов собирали из крови и желудочка головного мозга путем микродиализа проб через 18 временных интервалов. Концентрации лекарственного средства в этих образцах определяли с помощью капиллярного электрофореза с УФ-детектированием (CE-UV) с последующими расчетами для различных фармакокинетических параметров.

Шесть крыс анестезировали газообразным изофлураном (1% изофлуран в смеси газообразных 20% кислорода и 80% азота) и иммобилизовывали в стереотаксической раме (KOPF Instruments, Tujunga, CA). Анестезию поддерживали в течение всей процедуры. Каждую направляющую канюлю (CMA Microdialysis Inc., Acton, MA) стереотаксически имплантировали в боковой желудочек (AP -0,9, L 1,6, V 3,4, по отношению к темени и черепу) и затем крепили к черепу при помощи винтов и зубного цемента. После операции каждую крысу размещали индивидуально с предоставлением пищи и воды без ограничений в течение 3 дней для восстановления после хирургической катетеризации. Эксперименты по микродиализу проводили на находящейся в сознании свободно передвигающейся крысе. В день эксперимента мандрен направляющей канюли заменяли зондом для микродиализа (CMA/11 с 4 мм мембраной, CMA Microdialysis Inc., Acton, MA) и зонд для микродиализа в сосудах (CMA/20 с 4 мм мембраной, CMA Microdialysis Inc, Acton, MA) имплантировали в яремную вену. Зонды имели впускные трубочки, связанные со шприцами для доставки искусственной спинномозговой жидкости (146 мМ NaCl, 1,2 мМ CaCl₂, 3 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1,9 мМ Na₂HPO₄, 0,1 мМ NaH₂PO₄, pH 7,4) в желудочек и забуференного фосфатом физиологического раствора Дульбекко (D-PBS) в кровь со скоростью потока 0,5 мкл/мин. Впускные трубочки соединяли с коллектором для микрофракционирования для сбора микродиализатов при 4°C. Крысам давали восстановиться в течение по меньшей мере 24 ч перед введением доз. Восемнадцать образцов собирали в течение 3 ч после введения EDO-S101 (внутривенно). Все образцы подвергали капиллярному электрофорезу с УФ-детектированием (CE-UV) для определения концентрации EDO-S101 в цереброспинальной жидкости (CSF) и крови. Крыс забивали с помощью ингаляции CO₂ после эксперимента. Положение зонда подтверждали путем визуального осмотра в конце каждого эксперимента.

EDO-S101 в микродиализате измеряли с помощью CE-UV (Agilent 3D CE). Вкратце, капилляры прекондиционировали 1 М гидроксидом натрия в течение 2 мин, водой в течение 2 мин и подвижным буфером [100 ммоль/л раствор ацетата аммония (с доведением pH до 3,1 с помощью уксусной кислоты) - ацетонитрил (50:50, об./об.)] в течение 3 мин. Образцы вводили под давлением 4826,5 Па в течение 5 с, и инъекционный объем составлял приблизительно 5 нл. После инъекции EDO-S101 отделяли в объединенном кварцевом капилляре с внутр. диам. 50 мкм и длиной 50/65 см (эффективная длина/общая длина) при 15 кВ и 25°C. Оптическую плотность EDO-S101 определяли в УФ при 300 нм. Эмиссию улавливали на фотоумножителе (PMT).

Для осуществления статистического анализа данных использовали двухсторонний критерий ANOVA с повторными измерениями с последующим тестом Тьюки. P<0,05 рассматривали как значимый. Проникновение в ЦНС определяли как отношение области CSF и крови под кривой (AUC).

При анализе результатов обнаружено, что EDO-S101 хорошо пересекает гематоэнцефалический барьер с проникновением в ЦНС 16,5% (см. фиг. 1). Он может достичь высокой концентрации в ЦНС с C_{макс} 11,2 мкМ. Таким образом, EDO-S101 идеально подходит для терапевтического применения при опухолях головного мозга. Было также показано, что он имеет очень короткий период полужизни приблизительно 6 мин в крови и приблизительно 9 мин в головном мозге. Так как концентрации лекарственного средства определяли на основе поглощающей способности EDO-S101 при длине волны УФ 300 нм, все измерения касаются неметаболизированного EDO-S101. Результаты суммированы в табл. 1 следующим образом.

Таблица 1

Параметры PK	Кровь	Мозг
C _{макс} (мкМ)	184, 0±61, 8	11, 2±6, 5
T _{макс} (мин)	2, 33±0, 82	5, 67±1, 97
T _{1/2} (мин)	5, 6±1, 07	8, 8±1, 43
AUC (0-12) (мкМ. час)	824, 3±110, 8	136, 2±74, 7
Отношение AUC (Мозг: кровь)	16, 5±0, 09	

Пример 2. Тесты на активность *in vitro* для EDO-S101 и известных соединений против различных MGMT-позитивных и негативных клеточных линий.

Разработаны эксперименты *in vitro*, в которых использованы серии клеточных линий GBM, репрезентативных в отношении MGMT-негативных и MGMT-позитивных опухолевых клеток.

Соединения: 1-100 мкМ EDO-S101, 1-50 мкМ темозоломид (TMZ), 1-50 мкМ темозоломид+500 нМ вориностат, 1-40 мкМ бендамустин, 1-40 мкМ бендамустин и 500 нМ вориностат.

Клеточные линии: A172, LN229, SNB19, SW1783, U251, U373 и U87: MGMT-негативные клеточные

линии; LN18, Mz54, T98G, U138, U118: MGMT-позитивные клеточные линии.

Использовали двенадцать клеточных линий глиобластомы, представляющих классы III и IV глиом с различной экспрессией MGMT, чувствительностью к лекарственной и лучевой терапии, и пять стволовых клеток глиобластом от больных (смотри выше). Стволовые клетки четырех глиобластом, полученных от больных, любезно предоставленные J. Gregory Cairncross и Samuel Weiss из Hotchkiss Brain Institute, Faculty of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, и клетки, трансфицированные люциферазой, PTC#8, от Prof Angelo Vescovi, University la Bicocca, Milan, культивировали в бессывороточной культуральной среде определенного состава (SFM) и в культуре неприлипающих сфер. Клетки рессуспендировали в бессывороточной среде DMEM/F12 с 20 нг/мл эпидермального фактора роста (Sigma-Aldrich), 20 нг/мл основного фактора роста фибробластов (Sigma-Aldrich), добавкой B-27 1× (Gibco, Life Technologies) и антибиотиками. Лечение добавлением EDO-S101 проводили сразу после посева 3×10^3 клеток в 96-луночные планшеты со средой для стволовых клеток. Сферы подсчитывали через 5 дней после обработки под инвертированным микроскопом при увеличении $\times 4$. Сферы подсчитывали, если они имели по меньшей мере 15 клеток.

Клетки высевали при плотности 2×10^4 клеток/мл в 24-луночные планшеты. Клетки оставляли для прикрепления и роста в 5% FCS DMEM в течение 24 ч. По истечении этого времени клетки поддерживали в соответствующих условиях культивирования. Морфологический контроль проводили каждый день с помощью инвертированного фазово-контрастного фотомикроскопа (Nikon Diaphot, Tokyo, Japan) перед трипсинизацией клеток и подсчетом. Трипсинизированные и рессуспендированные в 1,0 мл физиологического солевого раствора клетки подсчитывали с использованием NucleoCounter™ NC-100 (систем автоматического подсчета клеток, Chemotec, Cydevang, DK) для оценки жизнеспособности клеток. Все эксперименты проводили в трех параллелях. Величины IC_{50} вычисляли по методу GraFit (Erithacus Software Limited, Staines, UK). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа с использованием бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (MTT, Sigma-Aldrich).

Были также определены величины IC_{50} и IC_{20} для всех двенадцати клеточных линий под действием бендамустина и вориностата, как описано выше. Затем были выполнены сочетанные анализы с фиксированной дозой вориностата (величина IC_{20}) и изменяющейся дозой бендамустина. Новые величины IC_{50} рассчитывали для бендамустина в сочетании с вориностатом.

Как можно видеть на фиг. 2, клеточные линии GBM U251, U373, SW1783, A172 и U87 высокочувствительны к TMZ, в то время как LN229, SNB19 и U138 умеренно чувствительны. MGMT-позитивные клеточные линии GBM LN18, Mz54, T98G и U118, однако, были устойчивы к TMZ.

В отдельном эксперименте TMZ использовали в сочетании с 500 нМ вориностата. Известно, что вориностат действует синергично с TMZ в клеточных линиях GBM. Как можно видеть на фиг. 3, в то время как MGMT-позитивные клеточные линии GBM LN18 и U118 чувствительны к этому сочетанию, T98G и Mz54 все еще остаются очень устойчивыми. IC_{50} T98G была снижена, но не находилась в диапазоне достижимых доз в организме человека.

На фиг. 4 продемонстрировано, что ни одна из клеточных линий GBM не была высокочувствительной к бендамустину, при этом клеточные линии GBM LN18, LN229, SNB19, U138, U251, U373, SW1783 и U87 были умеренно чувствительны к бендамустину, тогда как A172, Mz54, T98G и U118 были устойчивы к бендамустину. Как можно видеть на фиг. 5, когда бендамустин сочетался с 500 нМ вориностата, были достигнуты результаты, очень похожие на результаты с TMZ и вориностатом, т.е. все клеточные линии были высокочувствительны за исключением Mz54 и T98G и при этом IC_{50} T98G была снижена, но не находилась в диапазоне достижимых доз в организме человека.

По сравнению с другими отдельными соединениями и их сочетаниями, кривые IC_{50} для двенадцати протестированных клеточных линий на фиг. 6 показывают, что все двенадцать клеточных линий, включая все MGMT-позитивные клеточные линии, были высокочувствительны к EDO-S101. Это свидетельствует о том, что EDO-S101 является весьма перспективным терапевтическим агентом против как MGMT-негативных, так и MGMT-позитивных GBMs.

Сводка величин IC_{50} для различных клеточных линий представлена в последующей табл. 2.

Таблица 2

Клеточная линия	Происхождение	Характеристика	Венда-мустин	EDO-S101	Темозо-ломид
U251MG	Sigma-Aldrich (09063001)	MGMT-негативн.	30,0	6,60	20,0
U87MG	ATCC (HTB-14)	MGMT-негативн.	50,0	1,36	20,0
T98G	ATCC CRL-1690	MGMT-позитивн.	52,0	7,70	>100
U118MG	HTB-15	MGMT-позитивн.	35,0	6,61	>100
U373MG (Uppsala)	Sigma-Aldrich (08061901)	MGMT-негативн.	35,0	2,26	80,0
Mz-54	Goethe-University Frankfurt	MGMT-позитивн.	60,0	12,73	>100
A172	CRL-1620	MGMT-негативн.	55,0	6,45	□100
U138MG	ATCC (HTB-16)	MGMT-позитивн.	30,0	4,27	>100
LN228	ATCC (CRL-2611)	MGMT-негативн.	35,0	1,55	>100
SW1783	ATCC (HTB-13)	MGMT-негативн.	38,0	8,24	80,0
LN18	ATCC (CRL-2610)	MGMT-позитивн.	25,0	1,87	>100
SNB19	NCI	MGMT-негативн.	32,0	2,17	>100

Пример 3. Оценка EDO-S101 *in vivo* в мышинных моделях мультиформной глиобластомы.

Терапевтическую активность EDO-S101 против GBM определяли в мышинных моделях опухолей головного мозга, основываясь на росте опухоли, определенном по визуализации биолюминесценции, и на анализе выживаемости, определенной с помощью метода Каплана-Мейера.

Мышиные модели опухолей головного мозга создавали с помощью внутримозговой инъекции 3×10^5 клеток GBM12, трансфицированных люциферазой, бестимусным мышам под анестезией с использованием стереотаксической платформы. GBM12 представляет собой MGMT-негативную опухолевую клеточную линию. Бестимусным мышам в возрасте восемь недель давали акклиматизироваться/быть на карантине минимум 7 дней перед хирургическим вмешательством. Операцию выполняли в ламинарном боксе в стерильных условиях. Тайленол 300 мг/кг перорально давали для аналгезии за 24 ч до начала операции, продолжая давать в течение 48 ч после операции. Анестезия достигалась путем ингаляции 1-2% изофлурана. После хорошей наркотизации мышь помещали в стереотаксический прибор Kopf. Небольшим количеством мази с антибиотиками BNP (смесь бацитрацина, неомидина и полимиксина) смазывали ее глаза, чтобы предотвратить инфекцию и повреждение роговицы во время операции. Полосу из мягкой ткани помещали над телом и хвостом мыши для предотвращения чрезмерной потери тепла во время операции. Область кожи головы очищали 2% раствором бетадина и высушивали с помощью ватной палочки. Делали сагиттальный надрез в коже головы по средней линии.

Небольшое трепанационное отверстие просверливали в левой части черепа с помощью хирургического сверла (Kopf) или сверла Dremel в соответствии с координатами (AP: 0,5 мм, LM: 2,5 мм), определенными по ссылке на атлас мозга мыши Franklin и Paxinos. Твердую мозговую оболочку экспонировали хирургически, и гамильтоновский шприц на 10 мкл со скошенной иглой калибра 26S погружали в левое полушарие мозга на глубину до 3 мм и медленно (0,5 мкл/мин) инфузирвали 5 мкл 3×10^5 опухолевых клеток GBM12, трансфицированных люциферазой. Иглу оставляли на месте в течение 5 мин, чтобы предотвратить рефлюкс, а затем медленно вынимали.

Кожу смыкали скобками для ран. После операции мыши приходили в себя в теплой окружающей среде, и их возвращали в их клетки при возобновлении двигательной активности. Клетки помещали на

верхнюю часть электрической грелки для сведения к минимуму потери тепла тела во время восстановления. За мышами наблюдали после операции по меньшей мере два раза в день в течение 5 дней или до завершения восстановления. EDO-S101 (60 мг/кг массы тела) или бендамустин (50 мг/кг массы тела) вводили через хвостовую вену, начиная с +4 дня после внутримозговой имплантации опухолевых клеток, и затем в последующие +11 день и +18 день. Паралич конечностей рассматривался в качестве конечной точки при анализе выживаемости.

После внутримозговой инъекции клеток GBM всех мышей подвергали билюминесцентной визуализации (BLI) два раза в неделю, начиная с 4 дня после внутримозговой инъекции, для мониторинга в режиме реального времени роста опухоли *in vivo*. BLI проводили с использованием оптической системы формирования изображений Xenogen Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Мышей анестезировали изофлураном перед внутрибрюшинными инъекциями люциферина в дозе 150 мг/кг, что обеспечивает насыщающую концентрацию субстрата для фермента люциферазы. Пиковые люминесцентные сигналы регистрировались через 10 мин после инъекции люциферина. Интересующие области, охватывающие внутричерепную область сигнала, определяли с использованием программного обеспечения Living Image (Xenogen, Alameda, CA), и регистрировали общее количество фотонов/стерадиан/см².

Дисперсионный анализ ANOVA использовали для определения статистической значимости различий между экспериментальными группами в каждой временной точке. Кривые выживаемости Каплана-Мейера получали с использованием программного обеспечения Prism4 (GraphPad Software, LaJolla CA), и статистические различия между кривыми определяли с помощью лог-рангового теста. Различия с $P < 0,05$ рассматривали как значимые.

В модели ксенотрансплантата GBM (GBM12), полученного от больного, EDO-S101 вводили в.в. в дозе 60 мг/кг еженедельно на +4, +11, +18 дни после внутримозговой имплантации опухолевых клеток (доза MTD). Бендамустин давали в.в. в дозе 50 мг/кг еженедельно на +4, +11, +18 дни (доза MTD). EDO-S101, как установлено, обладал существенной терапевтической активностью с подавлением роста опухоли и продлением выживаемости с медианой выживаемости 66 дней по сравнению с 58 днями с бендамустином и 52 днями у контроля без лечения (смотри фиг. 7а и 7б). EDO-S101 обладает отличной терапевтической активностью против этой MGMT-негативной глиобластомы.

Аналогичным образом следовали представленной выше процедуре с использованием клеточных линий U87G и U251G. Опять EDO-S101 (60 мг/кг) вводили внутривенно через хвостовую вену, но в этих экспериментах его вводили на 1, 8 и 15 день. Вместо бендамустина для сравнения вводили TMZ в дозе 16 мг/кг в течение 5 последовательных дней, перорально. Мышей забивали через 28 дней.

График зависимости вероятного времени до прогрессии (TTP) (%) от времени на фиг. 8 для мышей, несущих имплантированные опухоли U251, демонстрирует, что TTP у мышей, которых лечили EDO-S101, было значительно длиннее, чем наблюдаемое как у контрольных мышей, так и у мышей, получавших TMZ. Аналогичное значительное увеличение TTP наблюдалось у мышей, несущих имплантированные опухоли U87, причем в случае EDO-S101 они имели значительно более длинное TTP, чем и у контроля, и с введением TMZ (фиг. 9).

Пример 4. Оценка EDO-S101 *in vivo* (одного или в сочетании с лучевой терапией) в мышинных моделях мультиформной глиобластомы в сравнении с лучевой терапией и темозоломидом (одного или в сочетании).

В первом эксперименте клеточные линии U251, U87 и T98G обрабатывали только облучением или облучением и EDO-S101.

Для клоногенного выживания экспоненциально растущие клетки (70% конfluence) культивировали в обычных средах и обрабатывали EDO-S101 в соответствующих концентрациях или носителем (конечная концентрация ДМСО 0,1%) в течение 24 ч. Облучение опухолевых клеток проводили с использованием 6 мВ линейного ускорителя Elekta Synergy с использованием клинически калиброванного поля облучения 30×30 см. Пластины плексигласа толщиной 2 см располагали выше и ниже матрасов с клеточной культурой, полностью заполненных средой для компенсации эффекта наращивания. Необлученные контроли обрабатывали идентично облученным клеткам за исключением радиационного воздействия. После обработки клетки разводили в соответствующей концентрации (1000 клеток) и вновь высевали в новую 100 мм чашку Петри (в трех параллелях) и инкубировали в течение 14 дней. На 14 день среду удаляли, и колонии фиксировали смесью метанол:уксусная кислота (10:1, об./об.) и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Колонии, содержащие более 50 клеток, подсчитывали. Эффективность посева (PE) рассчитывали как число наблюдаемых колоний/число посеянных клеток. Фракцию выживших рассчитывали как количество образованных колоний в обработанных чашках по сравнению с количеством образованных колоний в контроле. Кривые выживаемости анализировали с помощью статистического программного обеспечения SPSS (Chicago, IL) путем аппроксимации данных с помощью взвешенной, стратифицированной, линейной регрессии в соответствии с линейно-квадратичной формулой: $S(D)/S(O) = \exp(-aD + bD^2)$.

Для MGMT-негативной клеточной линии глиобластомы U251 измеренная IC₅₀ составляла 6,60 мкМ для EDO-S101 (по сравнению с 30 мкМ для бендамустина и 2 0 мкМ для темозоломида).

Для MGMT-негативной клеточной линии глиобластомы U87G измеренная IC₅₀ составляла 1,36 мкМ

для EDO-S101 (по сравнению с 50 мкМ для бендамустина и 20 мкМ для темозоломида).

Для MGMT-позитивной клеточной линии глиобластомы T98G измеренная IC_{50} составляла 7,70 мкМ для EDO-S101 (по сравнению с 52 мкМ для бендамустина и >100 мкМ для темозоломида).

Как можно видеть из фиг. 10, % уровня выживаемости клеток глиобластомы был значительно снижен, когда лучевую терапию использовали в сочетании с дозой EDO-S101 (2,5 мкМ или 5 мкМ), по сравнению только с лучевой терапией, во всех 3-х клеточных линиях GBM.

Далее, адаптируя метод, описанный в примере 3, получали подкожные модели ксенотрансплантатов GBMs у мышей с использованием клеточных линий GBM U251 и U87.

Мышей U251, полученных, как описано выше, подвергали либо лучевой терапии (2 Гр в течение 5 последовательных дней), либо лечению EDO-S101 (60 мг/кг внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения), либо только контрольным процедурам. Перед любым облучением мышей анестезировали смесью кетамина (25 мг/мл)/ксилазина (5 мг/мл). Анестезированные мыши-опухоленосители получали фокальное облучение в дозе 2 Гр в течение 5 последовательных дней. Облучение осуществлялось с помощью линейного ускорителя рентгеновских лучей с мощностью дозы 200 сГр/мин при комнатной температуре. Все мыши были защищены специально разработанным свинцовым аппаратом, позволяющим облучать правую заднюю конечность. Мышей содержали в этих условиях до окончания облучения.

Исследовали прогрессию GBM в соответствии с методом, описанным в примере 3. График зависимости вероятного времени до прогрессии (%) от времени показан на фиг. 11. Исходя из него, очевидно, что время до прогрессии у мышей, которых лечили EDO-S101, значительно длиннее, чем наблюдаемое при лечении опухолей лучевой терапией.

В дополнительном эксперименте мышей U251, полученных таким же способом, подвергали либо имеющимся в настоящее время золотым стандартом лечения - лучевой терапией и темозоломидом (2 Гр в течение 5 последовательных дней и 16 мг/кг в течение 5 последовательных дней, перорально), либо лечением EDO-S101 (60 мг/кг, внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения), либо лечением EDO-S101 и лучевой терапией (2 Гр в течение 5 последовательных дней и 60 мг/кг, внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения), либо контрольным воздействием. График зависимости вероятного времени до прогрессии (%) от времени показан на фиг. 12. Исходя из этого, очевидно, что время до прогрессии у мышей, которых лечили EDO-S101 и лучевой терапией, значительно длиннее, чем наблюдаемое для опухолей, обработанных только EDO-S101. Кроме того, время до прогрессии для сочетания лучевой терапии и EDO-S101 было значительно длиннее, чем наблюдаемое для опухолей, обработанных лучевой терапией и темозоломидом, текущим золотым стандартом лечения.

Следовали той же последовательности экспериментов, но на этот раз на мышинной модели подкожного ксенотрансплантата GBM, полученного с использованием клеточной линии GBM U87. В первом эксперименте мышей U87, полученных, как описано выше, подвергали либо лучевой терапии (2 Гр в течение 5 последовательных дней), либо лечению EDO-S101 (60 мг/кг внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения), либо только контрольному воздействию. Проводили исследование прогрессии GBM. График зависимости вероятного времени до прогрессии (%) от времени показан на фиг. 13. Исходя из этого, очевидно, что время до прогрессии у мышей, которых лечили EDO-S101 (обозначено на фиг. 13 как NL101), значительно длиннее, чем наблюдаемое для опухолей, на которые воздействовали лучевой терапией.

В дополнительном эксперименте, сходном с экспериментом на мышцах U251, мышей U87, полученных таким же способом, подвергали либо лечению, имеющимся в настоящее время золотым стандартом - лучевой терапией и темозоломидом (2 Гр в течение 5 последовательных дней и 16 мг/кг в течение 5 последовательных дней, перорально), либо лечению EDO-S101 (60 мг/кг, внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения), либо лечению EDO-S101 и лучевой терапией (2 Гр в течение 5 последовательных дней и 60 мг/кг, внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения), либо контрольному воздействию. График зависимости вероятного времени до прогрессии (%) от времени показан на фиг. 14. Исходя из этого, очевидно, что время до прогрессии у мышей, которых лечили EDO-S101 и лучевой терапией, значительно длиннее, чем наблюдаемое для опухолей, обработанных только EDO-S101. Кроме того, время до прогрессии для сочетания лучевой терапии и EDO-S101 было значительно длиннее, чем наблюдаемое для опухолей, обработанных лучевой терапией и темозоломидом, текущим золотым стандартом лечения. Следует также отметить, что время до прогрессии, выявленное у мышей U87, получавших только EDO-S101, было действительно выше, чем достигаемое совместным лечением лучевой терапией и темозоломидом.

Время до прогрессии опухолей росло от приблизительно 17-18 дней для контроля у мышинной модели ксенотрансплантата U251G, до 42 дней для сочетания лучевой терапии и темозоломида, до более 50 дней для одного EDO-S101 (значимость различий $P=0,924$), до значительно более 50 дней для сочетания EDO-S101 и лучевой терапии (значимость различий $P=0,0359$).

Установлено, что время до прогрессии опухолей росло от приблизительно 15 дней для контроля в мышинной модели ксенотрансплантата U87G, до 35 дней для сочетания лучевой терапии и темозоломида, до 40 дней для одного EDO-S101 (значимость различий $P=2372$), до существенно более 50 дней для сочетания EDO-S101 и лучевой терапии (значимость различий $P=0,0001$).

Пример 5. Гистологическая оценка опухолей: ортотопическая модель клеток U251, трансфицированных люциферазой.

Мышей, изотопно трансфицированных U251-люциферазой в соответствии с методом, описанным в примере 3, лечили лучевой терапией (2 Гр в течение 5 последовательных дней), темозоломидом (16 мг/кг в течение 5 последовательных дней, перорально), лучевой терапией и темозоломидом (2 Гр в течение 5 последовательных дней и 16 мг/кг в течение 5 последовательных дней, перорально), EDO-S101 (60 мг/кг, внутривенно на 1, 8 и 15 дни цикла лечения) или контрольным носителем.

Рост внутричерепной опухоли прослеживали с помощью системы визуализации Hamamatsu (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Мышей анестезировали от 2 до 4% изофлуораном (Baxter, Deerfield, IL, USA) с последующими внутрибрюшинными инъекциями 150 мг/кг d-люциферина (In Vivo Imaging Solutions). В одно и то же время измеряли пять животных, и люминесцентная камера была установлена на 1-минутной экспозиции, среднем биннинге, 1 f/стоп, заблокированном фильтре возбуждения и открытом фильтре испускания. Фотографическая камера была установлена на 2 с экспозиции, среднем биннинге и 8 f/стоп. Поле обзора было установлено на 22 см, чтобы захватить пять мышей сразу. Серийные изображения делали еженедельно, используя одинаковые настройки. Интенсивность биолюминесценции оценивали количественно с помощью программного обеспечения Living Image (Caliper Life Sciences).

Перед любым облучением мышей анестезировали смесью кетамина (25 мг/мл)/ксилазина (5 мг/мл). Анестезированные мыши-опухоленосители получали фокальное облучение в дозе 2 Гр в течение 5 последовательных дней. Облучение осуществлялось с помощью линейного ускорителя рентгеновских лучей с мощностью дозы 200 сГр/мин при комнатной температуре. Все мыши были защищены специально разработанным свинцовым аппаратом, позволяющим облучать правую заднюю конечность. Мышей содержали в этих условиях до окончания облучения.

Все изображения были получены в поперечной плоскости, используя следующие последовательности: поперечная T2-взвешенная турбо спин-эхо (TSE) последовательность (время повторения [TR] мсек/эхо время [TE] мс) 6766/120, количество полученных сигналов 4, матрица 192×192, примененная с толщиной сечения 0,9 мм, томографический шаг 0,0 мм и зеркальный угол 160°. Поле зрения составляло 36×60 мм², которое полностью включало опухоль с результирующим размером воксела 0,3×0,3×1,0 мм³.

Непрерывные переменные были обобщены в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD) или в виде медианы и 95% довер. инт. для медианы. Для непрерывных переменных, не имеющих нормального распределения, статистические сравнения между контрольными и опытными группами проводили путем использования критериев Крускала-Уоллиса. Для непрерывных переменных, имеющих нормальное распределение, статистические сравнения между контрольными и опытными группами проводили путем использования критерия ANOVA или t-теста Стьюдента для непарных данных (для двух сравнений).

Через 50 дней после начала различных схем лечения мышей забивали, и конечные внутричерепные поражения визуализировали у мышей, получавших лечение контрольным воздействием, EDO-S101, темозоломидом и лучевой терапией и темозоломидом. Результаты показаны на фиг. 15 и 16. Сходные результаты были достигнуты при исследовании как EDO-S101, так и темозоломида, в случае обоих 5 из 13 мышей были с опухолями определенной стадии (38,5%) по сравнению с 8 из 11 (72,7%) в контроле. Однако только 1 из 13 мышей, получавших EDO-S101, демонстрировала большое поражение, в то время как 2 из 13 мышей, получавших темозоломид, демонстрировали большие поражения. При исследовании лучевой терапии и темозоломида только 2 из 11 мышей (18,2%) демонстрировали поражения в конце исследования, хотя у обеих из них поражения были большими. Из этого можно заключить, что EDO-S101 является высокоэффективным в отношении предотвращения распространения GBMs.

Эффективность EDO-S101 в предотвращении распространения GBMs дополнительно подчеркивается на фиг. 17, представляющей график зависимости вероятности выживания (%) от времени (дни). Вероятность выживания мышей, которых лечили EDO-S101, была значительно больше, чем мышей, получавших либо лучевую терапию, либо темозоломид. Только мыши, получавшие сочетание лучевой терапии и темозоломида, показали более высокую общую вероятность выживания, чем один EDO-S101.

Пример 6. Оценка EDO-S101 in vivo в мышинных моделях первичной лимфомы ЦНС.

Повторяли методику примера 3 за исключением того, что мышинные модели были созданы с 1×10^5 клетками лимфомы OCI-LY10B, трансфицированными люциферазой, для создания модели первичной лимфомы ЦНС. EDO-S101 (60 мг/кг массы тела), бендамустин (50 мг/кг массы тела) и контроль вводили внутривенно через хвостовую вену отдельным группам испытуемых мышей на +4, +11 и +18 дни после внутримозговой имплантации клеток лимфомы OCI-LY10B. Как EDO-S101, так и бендамустин значительно подавляли рост опухоли и пролонгировали выживаемость с медианой выживаемости 62 и 54 дня соответственно по сравнению с 48 днями в контролях без лечения (смотри фиг. 18a и 18b). EDO-S101, следовательно, как представляется, является перспективным для лечения первичной лимфомы ЦНС.

Пример 7. Оценка EDO-S101 in vivo в мышинных моделях тройного метастатического рака молочной железы с метастазами в головной мозг.

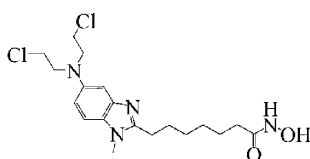
Повторяли метод примера 3, за исключением того, что мышинные модели были созданы с 1×10^5

клетками MB-468 рака молочной железы, трансфецированными люциферазой, для создания модели первичной лимфомы ЦНС. EDO-S101 (60 мг/кг массы тела), бендамустин (50 мг/кг массы тела) и контроль вводили внутривенно через хвостовую вену отдельным группам испытуемых мышей в единственной дозе на +4 день после внутримозговой имплантации клеток MB-4 68 рака молочной железы. EDO-S101 показал значительную терапевтическую активность с подавлением роста опухоли и пролонгированием выживаемости с медианой выживаемости 71 день по сравнению с 62 днями для бендамустина и 55 днями в контролях без лечения (смотри фиг. 19a и 19b). EDO-S101, следовательно, как представляется, является особенно перспективным для лечения метастатического рака мозга.

В заключение эксперименты показывают, что способность EDO-S101 проходить через гематоэнцефалический барьер является очень хорошей. Это делает его перспективным кандидатом для лечения злокачественных опухолей головного мозга. Экспериментальные данные, кроме того, показывают, что он активен не только против MGMT-негативных GBMs, но также и против MGMT-позитивных GBMs, что делает его весьма перспективным в качестве терапевтического агента для лечения MGMT-позитивных GBMs и других MGMT-позитивных астроцитарных опухолей головного мозга, так как для них до сих пор не было разработано никакого лечения. Премодемонстрировано также, что он значительно пролонгирует медиану выживаемости в случаях как первичной лимфомы ЦНС, так и метастатического рака головного мозга, что снова делает его весьма перспективным терапевтическим кандидатом для обоих состояний. Данные также показывают, что когда EDO-S101 вводят в сочетании с лучевой терапией, то он проявляет существенно улучшенную активность при лечении глиобластомы по сравнению только с одним EDO-S101.

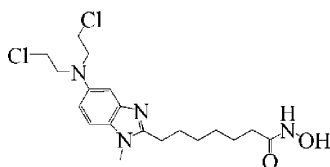
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака головного мозга, выбранного из MGMT-позитивной астроцитарной опухоли головного мозга, метастатического рака головного мозга и первичной лимфомы ЦНС, у больного, нуждающегося в этом, включающий введение указанному больному соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли



I.

2. Способ лечения MGMT-позитивной мультиформной глиобластомы у больного, нуждающегося в этом, включающий введение указанному больному соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли



I.

3. Способ по п.1, где MGMT-позитивная астроцитарная опухоль головного мозга выбрана из диффузной астроцитомы (класса II ВОЗ) и анапластической астроцитомы (класса III ВОЗ).

4. Способ по п.1, где метастатический рак головного мозга выбран из метастатического рака молочной железы, метастатической системной лимфомы, метастатического рака легкого, метастатической меланомы, метастатической саркомы и метастатического рака желудочно-кишечного тракта.

5. Способ по п.1, где метастатический рак головного мозга представляет собой метастатический рак молочной железы.

6. Способ по любому из пп.1-5, где фармакологически приемлемая соль соединения формулы I представляет собой гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, бисульфат, сульфамат, нитрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, салицилат, лактат, нафталинсульфонат или ацетат.

7. Способ по любому из пп.1-6, где соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль вводят внутривенно нуждающемуся в этом больному на уровне дозировки от 0,1 до 70 мг/кг массы тела больного.

8. Способ по п.7, где соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль вводят внутривенно нуждающемуся в этом больному на уровне дозировки от 0,5 до 50 мг/кг массы тела больного.

9. Способ по п.7 или 8, где соединение формулы I или его фармакологически приемлемую соль

вводят внутривенно нуждающемуся в этом больному на 1, 8 и 15 дни цикла лечения, на 1 и 8 дни цикла лечения или только на 1 день цикла лечения.

10. Способ по любому из пп.1-9, где нуждающийся в этом больной получает лучевую терапию либо до, либо после лечения опухоли головного мозга соединением формулы I или его фармакологически приемлемой солью.

11. Способ по п.10, где нуждающийся в этом больной получает лучевую терапию до лечения рака головного мозга соединением формулы I или его фармакологически приемлемой солью.

12. Способ по любому из пп.1-9, где нуждающийся в этом больной получает лечение соединением формулы I или его фармакологически приемлемой солью и лучевую терапию.

13. Способ по любому из пп.10-12, где указанное лечение облучением дается нуждающемуся в этом больному в дозе от 1 до 5 Гр в течение 5 последовательных дней и предпочтительно 2 Гр в течение 5 последовательных дней.

14. Способ по любому из пп.1-13, где указанный способ дополнительно включает одновременное, последовательное или раздельное введение нуждающемуся в этом больному ингибитора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и указанного соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли.

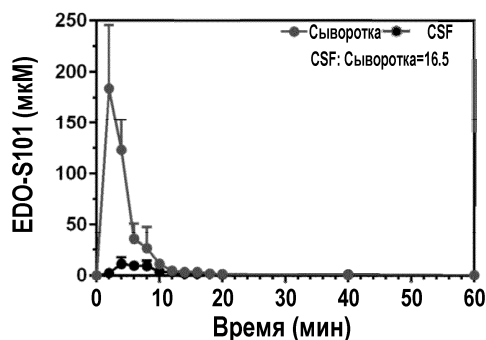
15. Способ по п.14, где указанный ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой бевацизумаб.

16. Способ по любому из пп.1-13, где указанный способ дополнительно включает одновременное, последовательное или раздельное введение нуждающемуся в этом больному ингибитора поли-(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) и указанного соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли.

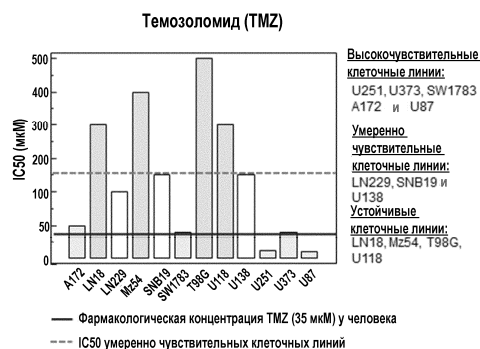
17. Способ по п.16, где указанный ингибитор поли-(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) выбран из рупакариба, олапариба и велипариба.

18. Способ по любому из пп.1-13, где указанный способ дополнительно включает одновременное, последовательное или раздельное введение нуждающемуся в этом больному ингибитора PD-1/PDL-1 (иммунной контрольной точки) и указанного соединения формулы I или его фармакологически приемлемой соли.

19. Способ по п.18, где указанный ингибитор PD-1/PDL-1 (иммунной контрольной точки) представляет собой ипилиумаб.

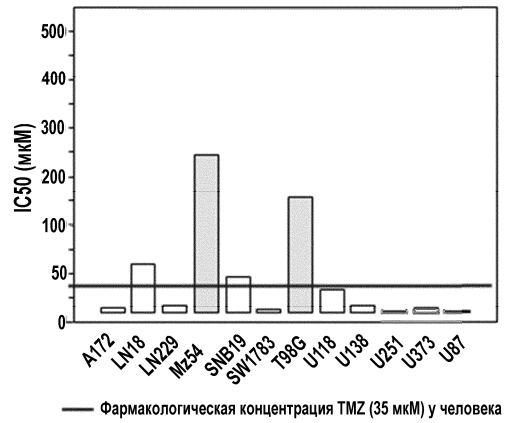


Фиг. 1



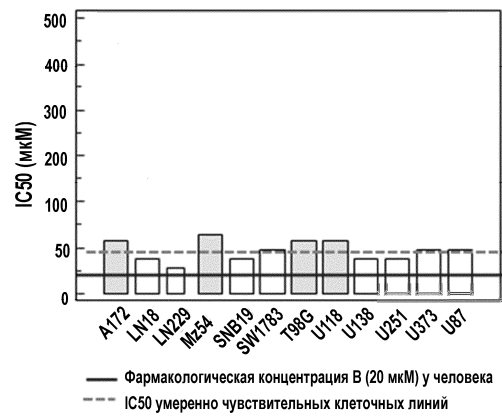
Фиг. 2

Темозоломид + 500 нМ вориностата



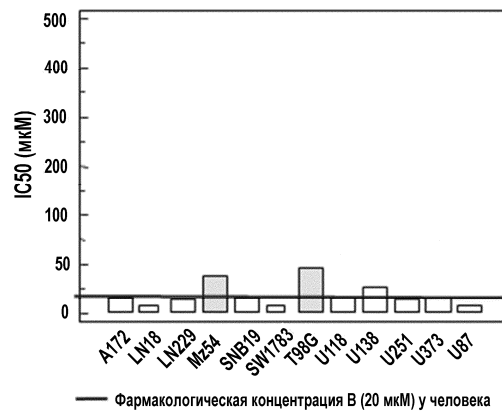
Фиг. 3

Бендамустин



Фиг. 4

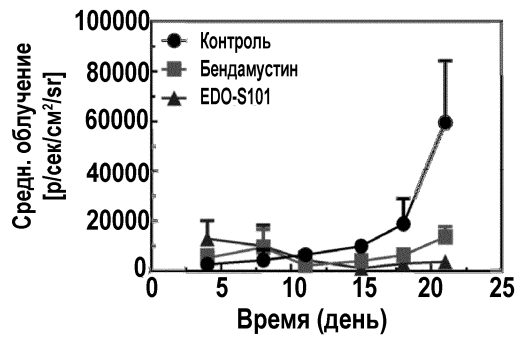
Бендамустин + 500 нМ вориностата



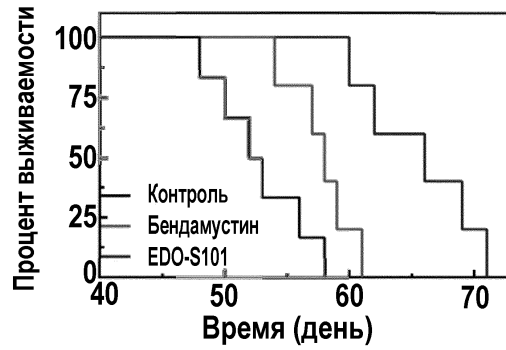
Фиг. 5



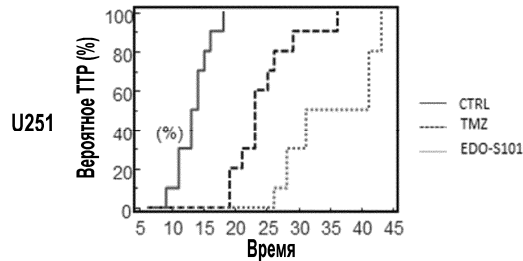
Фиг. 6



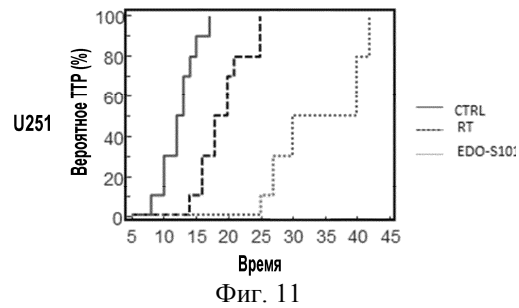
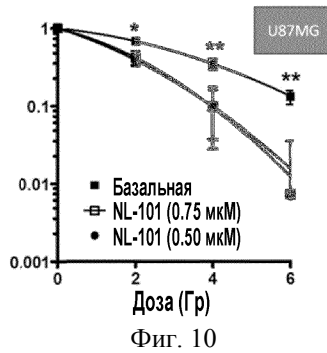
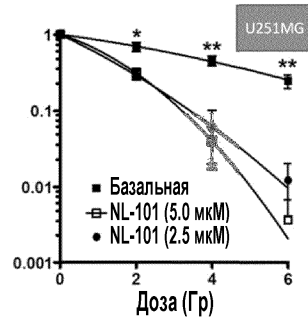
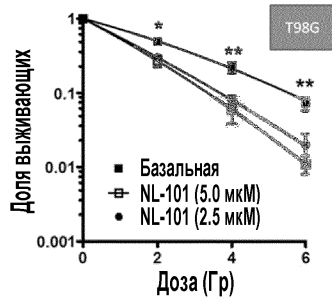
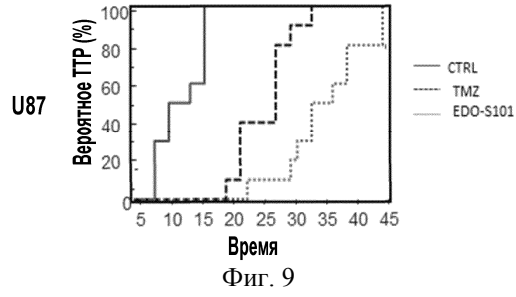
Фиг. 7a

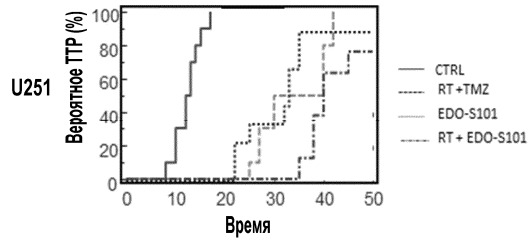


Фиг. 7b

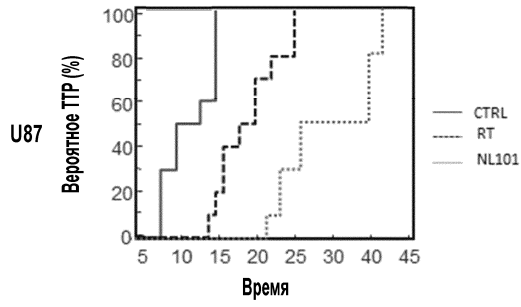


Фиг. 8

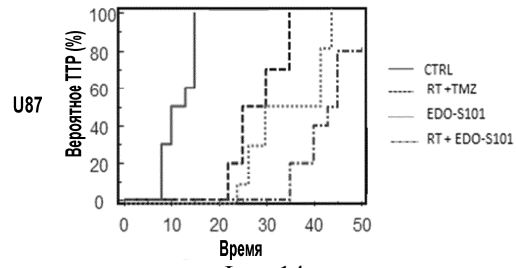




Фиг. 12

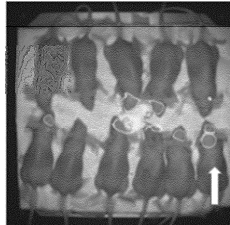


Фиг. 13

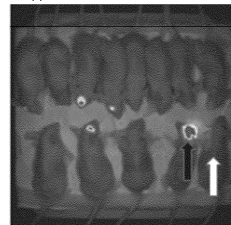


Фиг. 14

Контроль
(8/11 с опухолью, 72.7%)
50 дней – окончание лечения

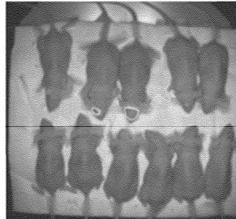


EDO-S101
(5/13 с опухолью, 38.5%)
50 дней – окончание лечения



Фиг. 15

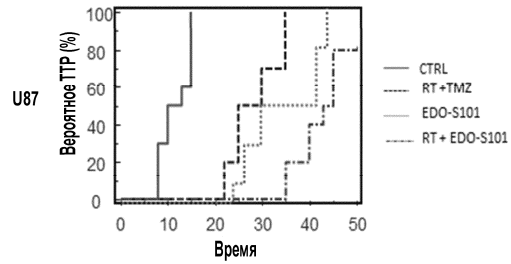
RT-TMZ
(2/11 с опухолью, 18.2%)
окончание лечения через 50 дней



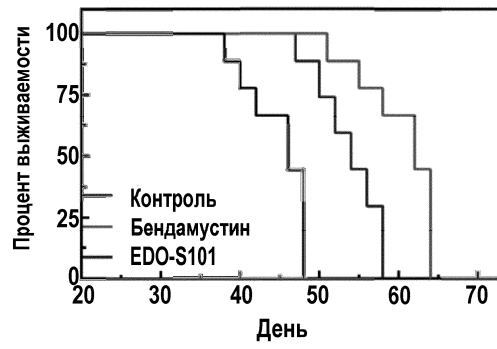
TMZ
(3-5/13 с опухолью, 23.1-38.5%)
окончание лечения через 50 дней



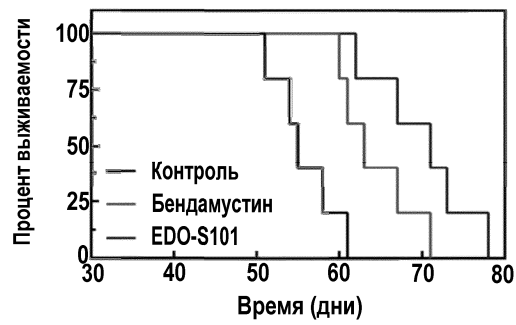
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

