



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2006100030/15, 09.06.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.06.2004

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.06.2003 US 60/477796

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2007 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 20.10.2011 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Roger B.Cohen. Epidermal growth factor
receptor as a therapeutic target in colorectal
cancer. Clinical colorectal cancer. February
2003, 246-251. ТЮЛЯНДИН С.А. Первые
результаты клинического применения
ингибиторов передачи внутриклеточных
сигналов. - Практическая онкология. т.3,
№4, 2002, с.236-244. ПЕРЕВОДЧИКОВА
Н.И. Химиотерапия (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.01.2006(86) Заявка РСТ:
US 2004/018451 (09.06.2004)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2005/001053 (06.01.2005)

Адрес для переписки:

101000, Москва, Центр, а/я 732, Агентство
ТРИА РОБИТ, пат.пов. Г.М.Вашиной,
рег.№ 139

(72) Автор(ы):

ВАКСАЛ Самуэль (US)

(73) Патентообладатель(и):

ВАКСАЛ Самуэль (US)

(54) СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ С ПОМОЩЬЮ
ВНЕКЛЕТОЧНОГО АНТАГОНИСТА И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО АНТАГОНИСТА

(57) Реферат:

Изобретение относится фармакологии и
медицине, в частности к способам
ингибирования в организме пациента-
млекопитающего рецептора фактора
эпидермального роста (EGFR) путем

комбинированного использования
внеклеточного антагониста рецепторной
тирозинкиназы и внутриклеточного
антагониста рецепторной тирозинкиназы.
Внеклеточный антагонист рецепторной
тирозинкиназы представляет собой антитело,

RU 2 431 500 C2

RU 2 431 500 C2

обладающее способностью ингибирования активации рецепторной тирозинкиназы путем взаимодействия с внеклеточной связывающей областью рецептора. Внутриклеточный антагонист рецепторной тирозинкиназы представляет собой малую молекулу, обладающую способностью ингибирования активации рецепторной тирозинкиназы путем взаимодействия с внутриклеточной связывающей областью рецептора, несущей

киназный домен, или путем взаимодействия с внутриклеточным протеином, участвующим в сигнальном каскаде реакций рецепторной тирозинкиназы. Предлагаемым изобретением предусматриваются фармацевтические композиции, содержащие внеклеточный и внутриклеточный антагонист EGFR. Изобретение обеспечивает повышенное или синергическое действие на рост опухоли. 2 н. и 9 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):

немелкоклеточного рака легкого - состояние проблемы в 2000 г. - Практическая онкология, №3 (сентябрь) 2000, с.29-37. Kurokava H. et al. ErbB (HER) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms. Clin. Cancer Res. 2003, Jan, 9 (1 Pt 2):511S-5S, PMID: 12538508.

R U 2 4 3 1 5 0 0 C 2

R U 2 4 3 1 5 0 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2006100030/15, 09.06.2004**

(24) Effective date for property rights:
09.06.2004

Priority:

(30) Priority:
09.06.2003 US 60/477796

(43) Application published: **20.07.2007 Bull. 20**

(45) Date of publication: **20.10.2011 Bull. 29**

(85) Commencement of national phase: **10.01.2006**

(86) PCT application:
US 2004/018451 (09.06.2004)

(87) PCT publication:
WO 2005/001053 (06.01.2005)

Mail address:

**101000, Moskva, Tsentr, a/ja 732, Agentstvo TRIA
ROBIT, pat.pov. G.M.Vashinoj, reg.№ 139**

(72) Inventor(s):

VAKSAL Samuehl' (US)

(73) Proprietor(s):

VAKSAL Samuehl' (US)

(54) METHOD FOR RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITION WITH USE EXTRACELLULAR ANTAGONIST AND INTRACELLULAR ANTAGONIST

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention concerns to pharmacology and medicine, particularly to methods of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibition in a body of a mammal patient by combined use of an extracellular antagonist of receptor tyrosine kinase and an intracellular antagonist of receptor tyrosine kinase. The extracellular antagonist of receptor tyrosine kinase represents an antibody inhibiting activation of receptor tyrosine kinase by interaction with an extracellular binding region of the receptor. The

intracellular antagonist of receptor tyrosine kinase represents a small molecule inhibiting activation of receptor tyrosine kinase by interaction with the intracellular binding region of the receptor bearing a kinase domain, or by interaction with an intracellular protein participating in signalling events of receptor tyrosine kinase reactions. The offered invention provides pharmaceutical compositions containing the extracellular and intracellular EGFR antagonist.

EFFECT: invention provides an improved or synergic effect on tumour growth.

11 cl

RU 2 431 500 C2

RU 2 431 500 C2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ПРЕДЛАГАЕМОЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[01] Предлагаемое изобретение относится к способам ингибирования рецепторных тирозинкиназ RTK (аббревиатура от receptor tyrosine kinase - рецепторная тирозинкиназа) с помощью внеклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ и внутриклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ. В частности, предлагаемое изобретение относится к способам лечения тирозинкиназа-обусловленных заболеваний и патологических состояний у млекопитающих путем введения в организм пациента внеклеточного и внутриклеточного антагонистов рецепторных тирозинкиназ.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[02] Рецепторные тирозинкиназы представляют собой трансмембранные протеины, которые участвуют в контроле и регулировании нескольких клеточных процессов, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, стимулирование жизнеспособности клеток и модулирование клеточного метаболизма. Лиганды для рецепторных тирозинкиназ представляют собой растворимые или мембранно-связанные пептиды или протеиновые гормоны. В общем случае связывание лиганда с рецепторными тирозинкиназами стимулирует активность тирозинкиназы данного рецептора, которая затем стимулирует сигнал-трансдукционный каскад биохимических и физиологических перестроек, кульминацией которых является синтез ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и деление клетки. В качестве примеров таких рецепторов могут быть названы рецептор эпидермального фактора роста EGFR (аббревиатура от epidermal growth factor receptor), рецептор инсулина, рецептор тромбоцитарного фактора роста PDGFR (аббревиатура от platelet-derived growth factor receptor), рецептор васкулярно-эндотелиального фактора роста VEGFR (аббревиатура от vascular endothelial growth factor receptor), рецептор фактора роста фибробластов FGFR (аббревиатура от fibroblast growth factor receptor), рецептор фактора роста гепатоцитов HGFR (аббревиатура от hepato-cyte growth factor receptor) и рецептор фактора роста нервов NGFR (аббревиатура от nerve growth factor receptor).

[03] В общем случае рецепторные тирозинкиназы имеют внеклеточную область, трансмембранный гидрофобный домен и внутриклеточную область, несущую киназный домен. Когда лиганд связывается с внеклеточной связывающей областью, на клеточной поверхности такой рецепторной тирозинкиназы происходит генерирование конформационной перестройки в рецепторе, которое влечет экспонирование сайтов фосфорилирования внутриклеточных доменов тирозинкиназы. Конформационная перестройка в рецепторе может генерироваться также вследствие гомодимеризации или гетеродимеризации с соответствующей рецепторной тирозинкиназой. Фосфорилирование этих доменов стимулирует тирозинкиназную активность, инициируя сигнал-трансдукционный каскад реакций, который, в свою очередь, приводит к активации генов и прогрессированию клеточного цикла и, в конечном счете, к пролиферации и дифференцировке клеток.

[04] Кроме того, у многих рецепторных тирозинкиназ и протеинкиназ связывание лиганда вызывает димеризацию каждого рецепторного мономера с последующим фосфорилированием выраженного набора тирозиновых остатков во внутриклеточной области его димерного партнера - этот процесс называется аутофосфорилированием. Процесс аутофосфорилирования обычно протекает в две стадии. На первой стадии происходит фосфорилирование тирозиновых остатков в фосфорилирующей «губе» вблизи каталитического сайта. Это приводит к конформационной перестройке,

которая облегчает связывание с рецептором аденозинтрифосфорной кислоты АТФ (аббревиатура от adenosine triphosphoric acid - аденозинтрифосфорная кислота) или протеиновых субстратов.

5 [05] Фосфорилированный рецептор затем служит в качестве стыковочного сайта для других протеинов, участвующих в сигнальной трансдукции, опосредствованной рецепторной тирозинкиназой. В число этих протеинов входит адаптерный протеин GRB2, который связывается со специфическим фосфотирозином на активированной рецепторной тирозинкиназе и связывается с Sos - другим
10 внутриклеточным протеином, который, в свою очередь, взаимодействует с неактивным комплексом Ras-GDP (Ras - это связывающий гуанозинтрифосфат GTP (аббревиатура от guanosine triphosphate - гуанозинтрифосфат) переключающийся протеин, способный поочередно принимать два состояния: активное «включенное» со связанным гуанозинтрифосфатом и неактивное «выключенное» со связанным
15 гуанозинтрифосфатом). Действие Sos в качестве фактора обмена гуанин-нуклеотид GEF (аббревиатура от guanine-nucleotide exchange factor - фактор обмена гуанин-нуклеотид) затем стимулирует образование активного комплекса Ras-гуанозинтрифосфат. Затем Ras индуцирует киназный каскад, кульминацией которого является активация киназы митоген-активируемого протеина MAP (аббревиатура от mitogen-activated protein - митоген-активируемый протеин). В частности, активированный Ras связывается с N-концевым доменом серинтреонинкиназы Raf. Raf, в свою очередь, связывается с киназой митоген-активированного протеина или регулируемой внеклеточным сигналом киназы MEK (аббревиатура от mitogen-activated
20 protein or extracellular signal-regulated kinase - киназа митоген-активированного протеина или регулируемой внеклеточным сигналом киназы), дуально-специфической протеинкиназой, и фосфорилирует ее, а MEK фосфорилирует как тирозиновый, так и сериновый остатки, а также активирует другую серинтреонинкиназу: киназу митоген-активируемого протеина (MAP). Киназа митоген-активируемого протеина (MAP) фосфорилирует много различных опосредствующих клеточные реакции протеинов, в том числе ядерные факторы транскрипции.

[06] Считается, что aberrации, имеющие место в каскаде сигнальных реакций, связанных с рецепторными тирозинкиназами, вносят вклад в возникновение ряда
35 патологических состояний, включая онкологические, сердечно-сосудистые, воспалительные и другие пролиферативные заболевания. Некоторые рецепторные тирозинкиназы были выявлены, например, при исследованиях онкологических заболеваний человека, связанных с мутантными формами рецепторов факторов роста, которые посылают клеткам сигнал на пролиферацию даже при отсутствии фактора
40 роста. Считается, что один из таких мутантных рецепторов, получивший обозначение «локус neu», вносит вклад в неконтролируемую пролиферацию определенных видов рака груди человека. Некоторые конкретные представители класса рецепторных тирозинкиназ также подозреваются в причастности к различным онкологическим
45 заболеваниям человека.

[07] Одним из видов рецепторных тирозинкиназ, участвующих в онкогенном процессе, является семейство рецептора эпидермального фактора роста EGF (аббревиатура от epidermal growth factor - эпидермальный фактор роста), которое
50 включает рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, известный также как erbB-1/HER1), рецептор HER2 (известный также как c-neu/erbB-2), erbB-3/HER3 и erbB-4/HER4 (HER - аббревиатура от human epidermal growth factor receptor - рецептор эпидермального фактора роста человека). Считается, например, что рецептор

эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептор HER2 играют решающую роль в процессах, регулирующих рост и выживаемость раковых клеток. В частности, предполагается участие рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в нескольких каскадах реакций, влияющих на выживаемость и защиту от апоптоза, утрату способности к дифференцировке, метастазу (включая миграцию и инвазию клеток), а кроме того, предполагается участие рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в ангиогенезе, способности солидных опухолей создавать свою собственную сосудистую систему путем образования новых кровеносных сосудов.

[08] Имеются сообщения, что у многих опухолей человека наблюдается экспрессия или сверхэкспрессия одного или более членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Конкретно, предполагается корреляция присутствия рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с неблагоприятным прогнозом, увеличенным риском распространения опухоли и укороченной общей выживаемостью при опухолях определенного типа. Предполагается также, что неблагоприятная общая реакция на химиотерапию и радиационную терапию на поздних стадиях заболевания может объясняться способностью рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) исправлять повреждения в опухолевых клетках, которые не были уничтожены вышеуказанными стандартными способами. Кроме того, исследования показали, что HER2-положительный метастатический рак груди является особенно агрессивным заболеванием, имеет более высокую вероятность рецидива, у больных HER2-положительным метастатическим раком груди более неблагоприятный прогноз и приблизительно вдвое более короткая ожидаемая продолжительность оставшейся жизни, нежели у больных HER2-отрицательным раком груди. Сверхэкспрессия рецептора HER2 наблюдается в 25-30% случаев первичного рака груди.

[09] Предполагается, что в онкогенном процессе замешаны также члены семейства рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR). Считается, например, что эти рецепторы играют роль в образовании опухоли, ангиогенезе и росте опухоли. Наблюдается избирательная экспрессия рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR) на эндотелиальных клетках, например, во время эмбриогенеза, и образование опухоли, и были разработаны антагонисты рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR), которые блокируют распространение рецепторами васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR), экспрессированными на эндотелиальных клетках, сигналов на уменьшение роста опухоли. Было обнаружено также наличие рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR) на некоторых неэндотелиальных клетках, таких как опухолевые клетки, продуцирующие рецепторы васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR), в которых для поддержки роста опухоли генерируется независимый от эндотелия аутокринный контур.

[010] Таким образом, при наличии надлежащих ингибиторов, регуляторов или модуляторов рецепторных тирозинкиназ была бы обеспечена возможность модулирования сигнальных каскадов реакций рецепторных тирозинкиназ для лечения или предотвращения этих патологических состояний. Ввиду того, что в онкогенном процессе участвуют рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептор васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR), эти тирозинкиназы были специфически направлены на противораковую лекарственную терапию. Эта терапия преимущественно включала или моноклональное антитело, блокирующее связывание лиганда с внеклеточным доменом рецептора, или синтез ингибитора тирозинкиназы, действующий непосредственно на внутриклеточную область рецепторной

тирозинкиназы для предотвращения трансдукции сигнала.

[011] В настоящее время в процессе клинических испытаний находятся различные ингибиторы моноклональных антител. Одним из примеров такого антитела является ЦЕТУКСИМАБ (cetuximab), которое является химерическим (человеко-мышинным) моноклональным антителом, обладающим способностью блокировать лиганд, связывающийся с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), предотвращать активацию рецептора и ингибировать рост клеток в культуре. В качестве еще одного примера такого антитела может быть упомянуто антитело АВХ-EGF, которое является полностью человеческим моноклональным антителом, специфическим к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) и обладающим способностью, согласно сообщениям, блокировать связывание эпидермального фактора роста и трансформирующего фактора роста TFG- α (TFG - аббревиатура от transforming factor of growth - трансформирующий фактор роста). Еще одно антитело, выпускаемое на рынок под товарным знаком «Герцептин» (Herceptin®) (непатентованное название - ТРАСТУЗУМАБ (trastuzumab)), представляет собой гуманизированное антитело, утвержденное для лечения HER2-положительного метастатического рака груди, оно предназначено для целенаправленного блокирования функции сверхэкспрессии протеина HER2.

[012] Кроме того, в настоящее время проводятся клинические испытания на различных маломолекулярных (являющихся «маломолекулярными соединениями») ингибиторах. В качестве одного из примеров таких ингибиторов тирозинкиназы может быть упомянут ингибитор, выпускаемый на рынок под товарным знаком «Иресса» (Iressa™), который представляет собой маломолекулярный ингибитор рецепторной тирозинкиназы эпидермального фактора роста, который, согласно сообщениям, обладает способностью ингибировать активность тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), проявляет цитостатическое действие по отношению к ряду раковых клеток человека, экспрессирующих функциональный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), и обладает способностью ингибирования пролиферации опухолевых клеток посредством повышающей регуляции протеина p27.

[013] Хотя в отношении применяемых в настоящее время видов терапии маломолекулярными соединениями, специфическими к рецепторным тирозинкиназам, и было установлено их подавляющее действие на рост опухолей при непрерывном применении, однако это применение иногда связано с тяжелыми побочными эффектами. Есть сообщения, что при прекращении применения маломолекулярного ингибитора рост опухоли возобновляется, и скорость этого роста может быть даже больше, чем она была до лечения. Кроме того, было показано, что продолжительное применение маломолекулярных ингибиторов тирозинкиназ приводит и к побочным эффектам иного рода, таким как высыпания, диарея, воспаления слизистых оболочек и нейтропения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДЛАГАЕМОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[014] Предлагаемым изобретением предусматривается создание способа ингибирования рецепторных тирозинкиназ путем применения внеклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы и внутриклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы. В частности, предлагаемым изобретением предусматривается создание способа лечения опосредствованных тирозинкиназами заболеваний и патологических состояний, таких как рост опухоли, у пациентов-млекопитающих путем введения в организм пациента совместно как внеклеточного

антагониста рецепторной тирозинкиназы, так и внутриклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы. В результате такого лечения имеет место повышенное или синергическое подавляющее действие на рост опухоли, превышающее действие, которое наблюдается в случае применения только внеклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы или только внутриклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы. Кроме того, предлагаемым изобретением предусматривается создание фармацевтических композиций, содержащих внеклеточный антагонист рецепторной тирозинкиназы и внутриклеточный антагонист рецепторной тирозинкиназы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДЛАГАЕМОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[015] Предлагаемым изобретением предусматривается создание способа ингибирования рецепторных тирозинкиназ с помощью внеклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы и внутриклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы. Рецепторная тирозинкиназа представляет собой трансмембранный поверхностный (на поверхности клетки) рецептор, имеющий внеклеточную область, трансмембранный гидрофобный домен и внутриклеточную область, несущую киназный домен. Внутриклеточный киназный домен активируется после активации внеклеточной области, которое может иметь место вследствие лигандного связывания или гомодимеризации или гетеродимеризации с другой рецепторной тирозинкиназой. При активировании внутриклеточного домена и стимулировании тирозинкиназы инициируется каскад реакций трансдукции сигнала рецепторной тирозинкиназы, вызывая тем самым активацию различных генов, инициирование прогрессирования клеточного цикла и, наконец, пролиферации и дифференцировки клеток.

[016] В предпочтительных вариантах осуществления предлагаемого изобретения рецепторная тирозинкиназа принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста, таких как EGFR или еrB-1, еrB-2, еrB-3 или еrB-4. В более предпочтительных вариантах осуществления предлагаемого изобретения рецепторная тирозинкиназа это EGFR, который представляет собой пронизывающий мембрану гликопротеин с молекулярной массой 170 килодальтон, обладающий способностью связываться, например, с эпидермальным фактором роста, TNF- α (TNF - аббревиатура от tumor necrosis factor - фактор некроза опухоли), амфирегулином, герапин-связывающим эпидермальным фактором роста HB-EGF (аббревиатура от herapin-bondong EGF - герапин-связывающий эпидермальным фактор роста), бетацеллюлин, эпирегулин и NRG2- α (NRG - аббревиатура от neuregulin - нейрегулин). К предпочтительным относится также вариант, когда рецепторная тирозинкиназа это HER2, протоонкоген, который кодирует трансмембранный рецепторный протеин с молекулярной массой 185 килодальтон. Кроме того, рецепторная тирозинкиназа может принадлежать к семейству рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGFR), которое включает такие рецепторы, как VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-4, нейропиплин-1 и нейропиплин-2. Лиганды, которые связываются с рецепторами VEGFR-1 и VEGFR-2, имеют изоформы рецептора васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ и VEGF₂₀₆).

[017] В качестве примеров других рецепторных тирозинкиназ, с которыми может связываться антагонист по предлагаемому изобретению, могут быть упомянуты (перечень не исчерпывающий) такие представители семейства рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), как PDGFR- α (который связывается с PDGF-AA, PDGF-BB и PDGF-AB) и PDGFR- β (который связывается с PDGF-BB); такие представители семейства рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR), как FGFR-1 и FGFR-2; представители семейства рецепторов фактора роста гепатоцитов (HGFR);

такие представители семейства рецепторов фактора роста нервов (NGFR), как CD27 и CD40, а также такие представители семейства рецепторов инсулина IR (аббревиатура от insulin receptor), как рецептор I инсулин-подобного фактора роста первого типа IGF-IR (аббревиатура от insulin-like growth factor I receptor - рецептор I инсулин-подобного фактора роста) и инсулиновый рецептор-аффинный рецептор (insulin receptor-related receptor - инсулиновый рецептор-аффинный рецептор).

[018] В контексте предлагаемого изобретения внеклеточные антагонисты рецепторных тирозинкиназ взаимодействуют с внеклеточной связывающей областью рецепторной тирозинкиназы через посредство достаточного физического или химического взаимодействия между антагонистом рецепторной тирозинкиназы и внеклеточной связывающей областью рецептора, так что имеет место ингибирование активности тирозинкиназы. Специалистам соответствующего профиля известны примеры таких химических взаимодействий, состоящих в образовании химических связей, включая ковалентные, ионные, водородные и другие связи между антагонистом рецепторной тирозинкиназы и внеклеточной связывающей областью.

[019] В контексте предлагаемого изобретения внутриклеточные антагонисты рецепторных тирозинкиназ ингибируют тирозинкиназную активность рецепторной тирозинкиназы, предотвращая фосфорилирование рецептора и/или фосфорилирование других протеинов, участвующих в различных сигнализирующих каскадах реакций рецепторных тирозинкиназ. Внутриклеточный антагонист рецепторной тирозинкиназы обладает способностью ингибировать тирозинкиназную активность рецепторной тирозинкиназы, связываясь с внутриклеточной областью, несущей киназный домен или ингибируя ее активность, или связываясь с внутриклеточным протеином, участвующим в сигнализирующем каскаде реакций рецепторной тирозинкиназы или ингибируя его активность.

[020] Специалистам соответствующего профиля должно быть понятно, разумеется, что, хотя внеклеточный антагонист и внутриклеточный антагонист должны работать на ингибирование одного и того же каскада реакций рецепторной тирозинкиназы, однако внеклеточный каскад реакций и внутриклеточный каскад реакций могут быть различающимися сигнализирующими каскадами реакций. Поэтому эти каскады реакций могут работать абсолютно независимо друг от друга, и внеклеточный каскад реакций может быть активирован, в то время когда внутриклеточный каскад реакций неактивирован, и наоборот. Более того, различным может быть также и механизм действия каждого из этих каскадов реакций, результатом чего также являются разная активация и разное сигнализирование.

[021] Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы предлагаемого изобретения полагают, что внеклеточный антагонист рецепторных тирозинкиназ ингибирует все каскады трансдукции сигнала, инициируемые конформационными перестройками во внеклеточной области рецепторных тирозинкиназ после активирования рецепторной тирозинкиназы. Это ингибирование охватывает как поверхностные рецепторные тирозинкиназы, так и те тирозинкиназы, которые подверглись интернализации внутрь клетки. Авторы предлагаемого изобретения полагают, например, что активированные рецепторные тирозинкиназы через выстеленное клатерином изъязвление могут быть интернализированы в цитоплазматическое тельце, сохранив при этом свою сигнальную активность. После интернализации такие рецепторы либо претерпевают рециклинг (отправляются обратно на поверхность клетки), либо подвергаются распаду в цитоплазматическом тельце или лизосоме. Связывание с рецептором какого-либо лиганда может

простимулировать рециклинг рецептора, в то время как связывание с ним другого рецептора (то есть образование гомодимера или гетеродимера) или антагониста может простимулировать распад рецепторной тирозинкиназы.

5 [022] В контексте предлагаемого изобретения внеклеточный и внутриклеточный антагонисты рецепторных тирозинкиназ могут быть биомолекулярными соединениями, маломолекулярными соединениями или же любыми другими веществами, которые обладают способностью ингибировать активацию рецепторной тирозинкиназы путем взаимодействия с внеклеточной связывающей областью
10 рецептора (то есть внеклеточный антагонист) или ингибировать фосфорилирование путем взаимодействия с внутриклеточным тирозинкиназным доменом или другим внутриклеточным протеином, участвующим в каскаде реакций (то есть внутриклеточный антагонист), тем самым в конечном счете ингибируя генную активацию или клеточную пролиферацию. В общем случае антагонисты рецепторных тирозинкиназ обладают способностью понижать активацию рецепторной тирозинкиназы без обязательного полного предотвращения или полного
15 прекращения активации рецепторной тирозинкиназы.

[023] В контексте предлагаемого изобретения в понятие «биомолекулярные соединения» включаются все аминокислоты, нуклеотиды, липиды и полимеры
20 моносахаридов, в целом имеющие молекулярную массу более 650 дальтон. Таким образом, в понятие «биомолекулярные соединения» включаются, например, олигопептиды, полипептиды, пептиды, а также протеины, олигонуклеотиды и полинуклеотиды, такие как, например, ДНК и РНК, а также олигосахариды и
25 полисахариды. Кроме того, в понятие «биомолекулярные соединения» включаются производные любых из вышеперечисленных веществ. К таким производным от веществ, включаемых в понятие «биомолекулярные соединения», относятся, например, липиды и гликолизированные производные олигопептидов, полипептидов, пептидов и
30 протеинов. Кроме того, к производным от веществ, включаемых в понятие «биомолекулярные соединения», включаются липидные производные олигосахаридов и полисахаридов, например липополисахариды. В наиболее типичных случаях биомолекулярные соединения - это антитела или их функциональные производные.

[024] Согласно предлагаемому изобретению такие антитела - биомолекулярные
35 соединения могут представлять собой, например, антитела, возникающие естественным образом, одновалентные фрагменты, такие как Fab (аббревиатура от fragment of antibody - фрагмент антитела), двухвалентные фрагменты, такие как (Fab')₂, одноцепочечные антитела, такие как одноцепочечные переменные
40 фрагменты антител Fv (аббревиатура (с перестановкой букв) от variable fragment - переменный фрагмент [антитела]), Fvs - аббревиатура (с перестановкой букв) от variable fragments - переменные фрагменты [антител(a)]; scFv - аббревиатура (с перестановкой букв) от single chain variable fragment - одноцепочечный переменный
45 фрагмент [антитела]), однодоменные антитела, многовалентные одноцепочечные антитела, антитела-димеры, антитела-тримеры, и т.д., которые могут быть как моноспецифическими, так и биспецифическими, обладая способностью специфического связывания с антигенами. Используемые в предлагаемом изобретении антитела могут быть также однодоменными антителами, обладающими способностью эффективного
50 связывания и включающими один антительный переменный домен, который обеспечивает эффективное связывание. В предлагаемом изобретении могут использоваться также антитела, являющиеся гомодимерами тяжелых [полипептидных] цепей и не имеющие легких [полипептидных] цепей и первого константного домена.

[025] В общем случае антитела, пригодные для использования в предлагаемом изобретении, содержат каркасные области FW (аббревиатура от framework region - каркасная область); FWs (аббревиатура от framework regions - каркасные области) человеческих переменных тяжелой и легкой [полипептидных] цепей V_H (аббревиатура от variable heavy chain - переменная тяжелая [полипептидная] цепь); V_L (аббревиатура от variable light chain - переменная легкая [полипептидная] цепь), а также человеческие комплементарность-определяющие области CDR (аббревиатура от complementarity-determining region - комплементарность-определяющая область); CDRs (аббревиатура от complementarity-determining regions - комплементарность-определяющие области). В предпочтительных вариантах осуществления предлагаемого изобретения области переменных тяжелой и легкой [полипептидных] цепей являются полностью человеческими последовательностями или производными от человеческих последовательностей. Кроме того, переменные домены антител, используемых в предлагаемом изобретении, могут быть полностью переменным доменом тяжелой или легкой [полипептидной] цепи антитела, или же это может быть функциональный эквивалент или мутант, или дериватив естественно возникшего домена или синтетического домена, сконструированного посредством технологий, известных специалистам соответствующего профиля. Возможно, например, соединение доменов, соответствующих антительным переменным доменам, с по меньшей мере одной недостающей аминокислотой. Важным характеристическим признаком является способность каждого домена связываться с комплементарным доменом с образованием антиген-связывающего сайта.

[026] Переменные домены легкой и тяжелой цепей из выбранного источника могут подвергаться инкорпорированию в химерические антитела с функциональными человеческими константными доменами. Антитела, используемые в предлагаемом изобретении, могут также подвергаться «гуманизации» и содержать одну или более комплементарность-определяющих областей нечеловеческого происхождения, привитых к человеческим каркасным областям. В альтернативных вариантах осуществления предлагаемого изобретения человеческие связывающие домены или антитела могут быть получены от трансгенных животных, в геном которых были введены неперестроенные сегменты человеческих иммуноглобулиновых генов Ig и в геноме которых эндогенные (например, мышинные) иммуноглобулиновые гены инактивированы (см. обзорную публикацию Брюггеманн и Тауссиг (Brüggemann and Taussig) в Curr. Opin. Biotechnol., том 8, страницы 455-458, 1997 год). Моноклональные антитела, полученные от таких мышей, являются человеческими.

[027] Предлагаемым изобретением предполагается также возможность использования функциональных эквивалентов антител, в число которых включаются полипептиды с аминокислотными последовательностями, которые практически идентичны аминокислотным последовательностям переменных или гиперпеременных областей полноразмерных антител. В настоящем описании аминокислотная последовательность считается «практически идентичной» другой аминокислотной последовательности, если гомология составляет по меньшей мере 70%, предпочтительно - по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 90% при определении гомологии по методу FASTA (FASTA - аббревиатура от Fast Alignment - буквально: быстрое совмещение), как описано в публикации Пирсон и Липман (Pearson and Lipman) в Proc.Natl.Acad.Sci. USA, том 85, страницы 2444-2448, 1988 год). В число применимых в предлагаемом изобретении антител включаются также антитела, для которых характеристики связывания

(например, аффинность и специфичность) подтверждены прямыми мутациями, методами «созревания аффинности», фагового дисплея или перестановки цепей.

[028] В качестве внеклеточного антагониста рецепторной тирозинкиназы предпочтительно используется антитело или смесь антител. Это антитело связывается с внеклеточным доменом и, в предпочтительном варианте, нейтрализует активацию рецепторной тирозинкиназы, например, путем блокирования рецепторной димеризации и/или лигандного связывания. В более предпочтительных вариантах внеклеточный антагонист рецепторной тирозинкиназы является антителом рецептора эпидермального фактора роста.

[029] В качестве одного из примеров таких антител рецептора эпидермального фактора роста может быть упомянуто антитело ЦЕТУКСИМАБ (cetuximab; IMC-C225), которое является химерическим (человеко-мышинным) моноклональным антителом IgG (IgG - аббревиатура от immunoglobulin G - иммуноглобулин G) (см., например, такие публикации, как патент США №4943533, выданный на имя Мендельсон и др. (Mendelsohn et al.); патент США №6217866, выданный на имя Шлессинджер и др. (Schlessinger et al.); патентные заявки США №08/973065 на имя Гольдштейн и др. (Goldstein et al.) и 09/635974 на имя Тойфель (Teufel); международную патентную заявку WO 99/60023 на имя Ваксал и др. (Waksal et al.) и международную патентную заявку WO 00/69459). Моноклональное антитело ЦЕТУКСИМАБ (cetuximab) специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста и блокирует связывание с лигандом, например, с таким, как эпидермальный фактор роста. Это блокирование интерферирует с эффектами активации рецептора эпидермального фактора роста, результатом чего является ингибирование роста опухоли, опухолевой инвазии, метастазов, репарации [опухолевых] клеток и ангиогенеза. В дополнение к этому либо в качестве альтернативы антитело ЦЕТУКСИМАБ (cetuximab) может стимулировать интернализацию комплекса рецептор-антитело, предотвращая дальнейшую стимуляцию рецептора его лигандом или посредством другого механизма.

[030] В качестве другого примера антитела рецептора эпидермального фактора роста может быть упомянуто антитело АВХ-EGF, которое является полностью человеческим моноклональным антителом IgG₂ (IgG₂ - аббревиатура от immunoglobulin G₂ - иммуноглобулин G₂). Антитело АВХ-EGF с высокой специфичностью связывается с рецептором эпидермального фактора роста, блокируя связывание рецептора эпидермального фактора роста с обоими его лигандами, эпидермальным фактором роста и трансформирующим фактором роста - альфа TFG (аббревиатура от transforming growth factor - трансформирующий фактор роста) (см., например, публикацию Фиглин и др. (Figlin et al.), Реферат 1102, представленный на 37-й ежегодной конференции Американского общества клинической онкологии ASCO (аббревиатура от American Society of Clinical Oncology - Американское общество клинической онкологии) в Сан-Франциско, Калифорния, США, 12-15 мая 2001 года). Аминокислотная последовательность и характеристика антитела АВХ-EGF, которое раньше было известно как клон E7.6.3, раскрыты в патенте США №6235883, выданном на имя Абдженикс, Инк. (Abgenix, Inc.), в тексте: колонка 28, строка 62, до колонка 29, строка 36, и на прилагаемых к упомянутому патенту чертежах, фиг.29-фиг.34. См. также публикацию Ян и др. (Yang et al.) в Critical. Rev.Oncol./Hematol., том 38(1), страницы 17-23; 2001 год.

[031] Антитело, выпускаемое на рынок под товарным знаком «Герцептин» (Herceptin®) (непатентованное название - ТРАСТУЗУМАБ (trastuzumab)),

представляет собой производное от рекомбинантной ДНК гуманизированное моноклональное антитело, обладающее избирательным высокоаффинным связыванием в клеточно-базированном анализе (аффинность (Kd) 5нМ) с внеклеточным доменом человеческого протеина EGFR2, HER2. Это антитело представляет собой
5 иммуноглобулин G₁-каппа (IgG₁ kappa), который содержит человеческие каркасные области с комплементарность-определяющими областями мышиноного или крысиного (murine) антитела (4D5), которое обладает способностью связываться с HER2 (см., например, международную патентную заявку WO 01/89666 на имя
10 Масс (Mass)).

[032] В число других антител рецепторов эпидермального фактора роста, которые могут использоваться в качестве внеклеточных рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению, входят следующие антитела: антитело EMD 72000 (производство компании «Мерк КГаА» (Merck KGaA)), которое представляет собой
15 гуманизированную версию мышиноного (murine) против-EGFR моноклонального антитела FMD 55900; антитело h-R3 (производство компании «ТераЦИМ» (TheraCIM)), которое представляет собой гуманизированное против-EGFR моноклональное антитело; антитело Y10, которое представляет собой мышиноное (murine) антитело и
20 было выращено против мышиноной (murine) гомологической мутации человеческого EGFRvIII; и антитело MDX-447 (производство компании «Медарекс» (Medarex)) (см. патенты США №5558864, выданный на имя Бендинг и др. (Bendig et al.), 5884093, выданный на имя Кеттлборо и др. (Kettleborough et al.), 5891996, выданный на имя Матео де Акоста дель Рио и др. (Mateo de Acosta del Rio et al.).
25

[033] Внеклеточный антагонист рецепторной тирозинкиназы по предлагаемому изобретению может быть также и антителом рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста. В число клеточных линий, продуцирующих антитела васкулярно-эндотелиального фактора роста, входят следующие клеточные линии: гибридная
30 клеточная линия DC101, которая продуцирует крысиное моноклональное антитело против мышиноного VEGFR-2 (Американская коллекция типовых культур АТСС (аббревиатура от American Type Culture Collection-Американская коллекция типовых культур, штамм HB 11534); гибридная клеточная линия M25.18A1, которая продуцирует мышиноное моноклональное антитело MAb 25 (MAb - аббревиатура
35 от monoclonal antibody - моноклональное антитело) против мышиноного VEGFR-2 (Американская коллекция типовых культур, штамм HB 12152); гибридная клеточная линия M73.24, которая продуцирует мышиноное моноклональное антитело MAb 73 (Американская коллекция типовых культур, штамм HB 12153), и
40 клеточная линия, которая продуцирует моноклональное антитело MAb 6.12, связывающееся с растворимым и экспрессированным на клеточной поверхности рецептором VEGFR-1 (Американская коллекция типовых культур, штамм РТА-3344). В число других гибридом, которые продуцируют антитела против рецептора VEGFR-1, входят следующие гибридомы (перечень не исчерпывающий): KM1730 (депонирована как FERM BP-5697); KM1731 (депонирована как FERM BP-5718); KM1732 (депонирована как FERM BP-5698); KM 1748 (депонирована как FERM BP-5699) и KM 1750 (депонирована как FERM BP-5700), раскрытые в международной патентной заявке WO 98/22616, международной патентной заявке WO 99/59636, акцептованной
45 заявке Австралии AU 1998, 50666 B2, и патентной заявке Канады CA 2328893. В качестве других примеров антител, специфических к рецептору VEGFR-2, могут быть названы антитело IMC-1C11 (см. международную патентную заявку WO 00/44777 на имя Чжу и др. (Zhu et al.), международную патентную заявку WO 01/90192 на имя
50

Чжу (Zhu)) и антитело IMC-2C6 (см. публикацию Лю и др. (Lu et al.); патентную заявку PCT/US02/20332 на имя Чжу (Zhu)).

[034] В данной отрасли известны и другие антагонисты рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста. Некоторые примеры антагонистов рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста описаны в таких источниках, как следующие патентные заявки США (серийный номер): 07/813593; 07/906397; 07/964507; 07/977451; 08/055269; 08/252517; 08/601891; 09/021324; 09/208786 и 09/919408 (все на имя Лемиска и др. (Lemischka et al.)); патент США №5840301, выданный на имя Рокуэлл и др. (Rockwell et al.); следующие патентные заявки США (серийный номер): 08/706804; 08/866969; 08/967113; 09/047807; 09/401163 и 09/798689 (все на имя Рокуэлл и др. (Rockwell et al.)); патентная заявка США серийный номер 09/540770 (на имя Витте и др. (Witte et al.)); и патентная заявка PCT/US01/06966 на имя Ляо и др. (Liao et al.). В таких источниках, как патент США №5861301, выданный на имя Терман и др. (Terman et al.), публикация Терман и др. (Terman et al.) в Oncogene, том 6, страницы 1677-1683 (сентябрь 1991), международная патентная заявка WO 94/10202 на имя Феррара и др. (Ferrara et al.) и международная патентная заявка WO 95/21865 на имя Людвиг (Ludwig), раскрываются антагонисты рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста и специфичные антитела против рецептора VEGFR-2. Кроме того, антитела против рецептора VEGFR-2 описываются в патентной заявке PCT/US95/01678 на имя «Кёва Хакко» (Kyowa Hakko). Антитела против рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста описаны также в патентной заявке США серийный номер 09/976787 на имя Чжу и др. (Zhu et al.). В патентах США №6177401, выданном на имя Ульрих и др. (Ulrich et al.), №5712395, выданном на имя Эпп и др. (App et al.) и №5981569, выданном на имя Эпп и др. (App et al.) описываются антагонисты рецепторов васкулярно-эндотелиального фактора роста, являющиеся органическими молекулами. Кроме того, известны биспецифичные антитела BsAbs (аббревиатура от bi-specific antibodies - биспецифичные антитела), которые представляют собой антитела, имеющие две разных антиген-связывающих специфичности или два разных антиген-связывающих сайта, направленных на рецепторную тирозинкиназу и на рецептор VEGFR-1 (см., например, патентные заявки США серийный номер 09/865198 на имя Чжу (Zhu) и серийный номер 60/301299 имя Чжу (Zhu)).

[035] Одним из специфичных антагонистов васкулярно-эндотелиального фактора роста является «Авастин» (Avastin™) (непатентованное название БЕВАЦИЗУМАБ (bevacizumab), производство компании «Дженентек» (Genentech)), представляющий собой рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело против васкулярно-эндотелиального фактора роста rhuMab-VEGF (аббревиатура от recombinant humanized monoclonal antibody to VEGF - рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело против васкулярно-эндотелиального фактора роста). «Авастин», который предназначен для связывания с васкулярно-эндотелиальным фактором роста и его ингибирования, участвует в клинических испытаниях Phase III («Фаза III») на пациентах с раком ободочной и прямой кишки с первоначальной границей улучшения общей выживаемости.

[036] Что касается внутриклеточных антагонистов тирозинкиназ, то в предпочтительных вариантах осуществления предлагаемого изобретения в качестве таковых используются так называемые маломолекулярные соединения (или «малые молекулы»). Такие маломолекулярные соединения могут представлять собой органические соединения, металлоорганические соединения, соли таких органических и металлоорганических соединений, а также неорганические соединения. Атомы в

молекуле маломолекулярного соединения могут быть связаны посредством ковалентных и ионных связей; первое типично для таких маломолекулярных органических соединений, как ингибиторы тирозинкиназ, а последнее - для неорганических маломолекулярных соединений. Что касается структуры молекулы органического маломолекулярного соединения, то есть характера расположения атомов в ней, то это может быть цепь, например, углерод-углеродная цепь или углерод-гетероатомная цепь, или же это может быть кольцевая структура, составленная из атомов углерода, как, например, бензольное кольцо или полициклическая система, или же содержащая помимо атомов углерода также и другие атомы, то есть, это может быть гетероциклическая система, как, например, пиримидин или хиназолин. Хотя маломолекулярные соединения могут иметь любую молекулярную массу, однако в эту категорию обычно включаются соединения с молекулярной массой не более 650 дальтон, так как иначе их следовало бы отнести к биологическим соединениям («биомолекулярным соединениям»).

Маломолекулярными соединениями, пригодными для использования в предлагаемом изобретении, могут быть как соединения, встречающиеся в природе: такие как гормоны, нейротрансмиттеры, нуклеотиды, аминокислоты, сахара, липиды и их производные, так и соединения, полученные путем синтеза - как путем традиционного органического синтеза, так и путем биосинтеза, или же комбинацией того и другого (см., например, публикацию Ганесан (Ganesan) в Drug Discov. Today, том 7(1), страницы 47-55, январь 2002 года; публикацию Лоу (Lou) в Drug Discov. Today, том 6(24), страницы 1288-1294, декабрь 2001 года).

[037] В более предпочтительных вариантах осуществления предлагаемого изобретения маломолекулярным соединением, которое может быть использовано в качестве внутриклеточного антагониста тирозинкиназ, является внутриклеточный антагонист рецептора эпидермального фактора роста, конкурирующий с АТФ за связывание с внутриклеточной связывающейся областью рецептора эпидермального фактора роста, имеющей киназный домен, или с протеинами, участвующими в каскадах реакций трансдукции сигнала активации рецептора эпидермального фактора роста. В качестве примеров таких каскадов реакций трансдукции сигнала могут быть названы следующие каскады реакций: каскад реакций Ras-митоген-активированной протеинкиназы MAPK (аббревиатура от mitogen activated protein kinase - митоген-активированная протеинкиназа), каскад реакций фосфатидилинозитал-3-киназа-Akt P13K-Akt (аббревиатура от phosphatidylinosital-3 kinase-Akt - фосфатидилинозитал-3-киназа-Akt), каскад реакций стресс-активированной протеинкиназы SAPK (аббревиатура от stress-activated protein kinase - стресс-активированная протеинкиназа), а также каскады реакций сигнальных транс-дукторов и активаторов транскрипции STAT (аббревиатура от signal transducers and activators of transcription - сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции). В качестве примеров протеинов, которые вовлечены в такие каскады реакций (и с которыми может связываться малая молекула - антагонист рецептора эпидермального фактора роста по предлагаемому изобретению) могут быть упомянуты следующие протеины (перечень не исчерпывающий): GRB-2, SOS, Ras, Raf, MEK, MAPK, а также матричные металлопротеиназы MMPs (аббревиатура от matrix metalloproteinases - матричные металлопротеиназы).

[038] Одним из примеров маломолекулярного соединения - антагониста рецептора эпидермального фактора роста является соединение, выпускаемое на рынок под товарным знаком «Иресса» (Iressa™) (ZD1939), которое представляет собой

производное хинозалина, которое действует в качестве АТФ-миметика для ингибирования рецептора эпидермального фактора роста (см. патент США №5616582, выданный на имя «Зенека Лимитед» (Zeneca Limited); международную патентную заявку WO 96/33980 на имя «Зенека Лимитед» (Zeneca Limited), а также публикацию Ровински и др. (Rovinski et al.), Реферат 5, представленный на 37-й ежегодной конференции Американского общества клинической онкологии в Сан-Франциско, Калифорния, США, 12-15 мая 2001 года; публикацию Аниро и др. (Aniro et al.), Реферат 1712, представленный на 37-й ежегодной конференции Американского общества клинической онкологии в Сан-Франциско, Калифорния, США, 12-15 мая 2001 года).

[039] В качестве еще одного примера маломолекулярного соединения - антагониста рецептора эпидермального фактора роста может быть упомянуто соединение, выпускаемое на рынок под товарным знаком «ТАРЦЕВА» (TARCEVA™) (OSI-774), которое представляет собой производный от четырехзамещенного фениламино-хинозолина ингибитор рецептора эпидермального фактора роста [6,7-бис(2-метилокси-этоксид)-хиназолин-4-ил]-[(3-этинил-фенил)амин гидрохлорид] (см. международную патентную заявку WO 96/30347 на имя «Пфицер Инк.» (Pfizer Inc.), например, текст, начиная со страницы 2, строка 12, до страницы 4, строка 34, и текст начиная на странице 19, строки 14-17; см. также публикацию Мойер и др. (Moyer et al.) в Cancer Res., том 57, страницы 4838-4848, 1997 год; публикацию Поллак и др. (Pollack et al.) в J.Pharmacol., том 291, страницы 739-748, 1999 год). Соединение «ТАРЦЕВА» (TARCEVA™) может действовать путем ингибирования фосфорилирования рецептора эпидермального фактора роста и его каскадов реакций сигнальной трансдукции PI3/Akt и митоген-активированной протеинкиназы в прямом направлении, результатом чего является блокирование p27-опосредствованного клеточного цикла (см. публикацию Идальго и др. (Hidalgo et al.), Реферат 281, представленный на 37-й ежегодной конференции Американского общества клинической онкологии в Сан-Франциско, Калифорния, США, 12-15 мая 2001 года).

[040] Имеются сообщения также о других маломолекулярных соединениях, обладающих способностью ингибировать рецептор эпидермального фактора роста, в отношении многих из которых считается, что они связываются с тирозинкиназным доменом рецептора эпидермального фактора роста. К числу таких маломолекулярных соединений могут быть отнесены трициклические соединения, описываемые в патенте США №5679683; производные хинозолина, описанные в патенте США №5616582, а также индоловые соединения, описанные в патенте США №5196446. Кроме того, маломолекулярные соединения - антагонисты рецептора эпидермального фактора роста описаны в таких публикациях, как международная заявка WO 91/116051, международная заявка WO 96/30347, международная заявка WO 96/33980, международная заявка WO 97/27199 (на имя «Зенека Лимитед» (Zeneca Limited)), международная заявка WO 97/30034 (на имя «Зенека Лимитед» (Zeneca Limited)), международная заявка WO 97/42187 (на имя «Зенека Лимитед» (Zeneca Limited)), международная заявка WO 97/49688 (на имя «Пфицер Инк.» (Pfizer Inc.)), международная заявка WO 98/33798 (на имя «Уорнер Ламберт Компани» (Warner Lambert Company)), WO 00/18761 (на имя «Сианамид Компани» (Cyanamid Company)) и международная заявка WO 00/31048 (на имя «Уорнер Ламберт Компани» (Warner Lambert Company)). К тирозинкиназным ингибиторам рецептора эпидермального фактора роста естественного происхождения относятся генистеин (genistein), гербимицин А (herbimycin A), кверцетин (quercetin) и эрбстатин (erbstatin).

[041] В качестве примеров специфичных маломолекулярных соединений - антагонистов рецептора эпидермального фактора роста могут быть упомянуты соединение - ингибитор тирозинкиназ, в частности, рецептора эпидермального фактора роста, обозначенный как C11033 (от компании «Пфизер» (Pfizer)) и представляющее собой хинозалин-(N-[4-(3-хлоро-4-фторо-фениламино)-7-(3-морфолин-4-ил-пропокси)-хиназолин-6-ил]-акриламид), который описан в международной заявке WO 00/31048 на странице 8, строки 22-26; пирроло-пиримидиновое соединение - ингибитор рецептора эпидермального фактора роста, обозначенное как PKI 1 16 (от компании «Новартис» (Novartis)), которое описано в международной заявке WO 97/27199 на страницах 10-12; соединение - ингибитор рецептора эпидермального фактора роста и рецептора HER2, обозначенное как GW 2016 (от компании «ГлаксоСмитКлайн» (GlaxoSmithKline)); соединение ЕКВ569 (от компании «Ует» (Wyeth)), заявляемое в качестве ингибитора роста опухолевых клеток со сверхэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста или рецептора HER2 *in vitro* и *in vivo*; соединение AG-1478 («Трифостин» (Tryptostin)), представляющее собой хинозалиновое маломолекулярное соединение, обладающее ингибирующей способностью по отношению к сигнализации как от рецептора эпидермального фактора роста, так и от рецептора erbB-2; соединение AG-1478 («Сугген», от компании «Фармация и Реплиген» (Sugen, Pharmacia and Repligen)), которое является бисубстратным ингибитором, обладающим также ингибирующей способностью по отношению к протеинкиназе СК2; соединение PD 153035 (от компании «Парк-Дейвис» (Parke-Davis)), заявляемое как обладающее ингибирующей способностью по отношению к киназной активности рецептора эпидермального фактора роста и опухолевого роста, способностью индуцировать апоптоз клеток в культуре и повышать цитотоксичность химиотерапевтических агентов; соединение SPM-924 (от компании «Шварц Фарма» (Schwarz Pharma)), которое представляет собой ингибитор тирозинкиназ, предназначенный для лечения рака предстательной железы; соединение CP-546986 (от компании «Оу-Эс-Ай Фармасьютикалз» (OSI Pharmaceuticals)), заявляемое как ингибитор ангиогенеза при лечении солидных опухолей; соединение - ингибитор киназной активности рецептора эпидермального фактора роста, обозначенное как ADL-681, которое предназначено для лечения рака; пиридопиримидиновое соединение, обозначенное как PD 158780, о котором сообщается, что оно ингибирует скорость опухолевого роста ксенотрансплантата А4431 у мышей; хинозалиновое соединение CP-358,774, о котором сообщается, что оно ингибирует аутофосфорилирование в ксенотрансплантатах HN5 у мышей; хинозалиновое соединение ZD1839, о котором сообщается, что оно обладает противоопухолевым действием по отношению к мышинным ксенотрансплантантным моделям, включая такие виды рака, как рак наружных женских половых органов, немелкоклеточный рак легких NSCLC (аббревиатура от non-small cell lung cancer - немелкоклеточный рак легких), рак предстательной железы, рак яичников и рак прямой и ободочной кишки; пирролопиримидиновое соединение, обозначаемое как CGP 59326A, о котором сообщается, что оно ингибирует рост EGFR-положительных ксенотрансплантатов у мышей, а также соединения класса дианилинофталимидов, обозначаемые как PD 165557 (от компании «Пфизер» (Pfizer)); CGP54211 и CGP53353 (от компании «Новартис» (Novartis)).

[042] Внутриклеточный антагонист рецепторных тирозинкиназ может быть также ингибитором Ras-протеина - протеина, участвующего в каскаде реакций сигнальной трансдукции рецептора эпителиального фактора роста. Такие ингибиторы могут

иметь мишенью фарнезилтрансферазу, которая представляет собой фермент, активирующий Ras-протеин, и к таким ингибиторам относятся, например, следующие соединения: R115777 «Заместра» (Zamestra) (от компании «Орто-Биотек» (Ortho-Biotech)), которое используется в комбинации с гемцитабином (gemcitabine) для
5 лечения Ras-обусловленных опухолей; SCH66336 (от компании «Шеринг Плау» (Schering Plough)), о котором имеются сообщения о применимости его для лечения ряда различных солидных опухолей, включая метастатический рак мочевого пузыря, прогрессирующий рак поджелудочной железы и плоскоклеточный
10 эпидермоидный рак головы и шеи; BMS-214662 «Птаза» (Ptase) (от компании «Бристол-Майерс Сквибб» (Bristol-Myers Squibb)), о котором имеются сообщения о применимости его для лечения острого лейкоза, миелодиспластического синдрома и хронического миелоидного лейкоза; L-778,123 (от компании «Мерк» (Merck)), которое
15 представляет собой ингибитор пептидо-миметической фарнезил-протеин-трансферазы FPTase (аббревиатура от farnesyl protein transferase - фарнезил-протеин-трансфераза), о котором имеются сообщения о применимости его для лечения рецидивирующих или резистентных солидных опухолей; CP-609-754 (от компании «Оу-Эс-Ай Фармасьютикалз» (OSI Pharmaceuticals) и от компании «Пфицер» (Pfizer));
20 которое представляет собой ингибитор Ras-фарнезилирования и о котором имеются сообщения о применимости его для лечения солидных раковых опухолей, а также AZD-3409 (от компании «АстраЗенека» (AstraZeneca)), которое представляет собой ингибитор фарнезил-протеин-трансферазы, предназначенный для лечения солидных
опухолей.

[043] Внутриклеточный антагонист рецепторных тирозинкиназ может быть также Ras-Raf-модулятором, таким как, например, 43-9006 (от компании «Оникс Фармасьютикалз» или от компании «Байер» (Onyx Pharmaceuticals/Bayer)), который
25 представляет собой маломолекулярное соединение, мишенью для которого являются клетки с мутацией в Ras-гене, для ингибирования Raf-киназы и блокирования Ras-сигнальных каскадов реакций, и который применим для лечения рака толстой кишки, рака легких, рака поджелудочной железы и других видов рака, а также других
30 заболеваний пролиферативного характера; Ras-антагонист FTS (Thyreos), который, согласно сообщениям, обладает способностью инактивировать мутантные Ras-протеины и применим для лечения меланомы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака легких, рака груди и других видов рака.

[044] В качестве других примеров внутриклеточных антагонистов рецепторных тирозинкиназ, не обязательно маломолекулярных соединений или антагонистов,
35 специфичных только к рецептору эпидермального фактора роста, могут быть упомянуты такие стирл-замещенные гетероарильные соединения, которые описаны в патенте США №5656655, такие бис-, моно- и бициклические арильные и гетероарильные соединения, которые описаны в патенте США №5646153; соединение PD 153035, описанное в публикации Фрай и др. (Fry et al.) в Science, том 265,
45 страницы 1093-1095, август 1994 года; такие трипостины, которые описаны в публикации Ошеров и др. (Osharov et al.) в J.Biol.Chem., том 268, №15, страницы 11134-11142, 1993 год, и соединения PD166285 (6-арил-пиридо[2,3-d]пиримидины), описанные в публикации Панек и др. (Panek et al.) в J.Pharm and Exp. Therapeutics,
50 том 283, №3, страницы 1433-1444, 1997 год.

[045] Кроме того, внутриклеточный антагонист рецепторных тирозинкиназ может быть также маломолекулярным антагонистом рецептор васкулярно-эндотелиального фактора роста, например, таким как AXD-6474 (от компании

«АстраЗенека» (AstraZeneca)), который, согласно сообщениям, обладает способностью ингибирования ангиогенеза; CEP-5214, который является модулятором сигнальной трансдукции; или ZD-6474, который является ингибитором рецепторной тирозинкиназы васкулярно-эндотелиального фактора роста и который, согласно сообщениям, обладает способностью разрывать сигнальный каскад реакций при ангиогенезе, что делает его применимым для лечения прогрессирующих солидных опухолей.

[046] Упомянутые выше внеклеточные и внутриклеточные антагонисты тирозинкиназ были описаны только для примера, имеются и другие внеклеточные и внутриклеточные антагонисты тирозинкиназ, обладающие способностью ингибирования тирозинкиназной активности, которые хорошо известны специалистам соответствующего профиля и/или могут быть легко идентифицированы и потому также включаются в объем предлагаемого изобретения. Для идентификации таких других антагонистов могут применяться различные тесты на ингибирование тирозинкиназ, хорошо известные специалистам соответствующего профиля.

[047] Например, поскольку антагонисты рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению в целом предполагают ингибирование или регулирование событий фосфорилирования, для определения антагонистов, полезных в контексте предлагаемого изобретения, могут применяться испытания на фосфорилирование. Такие испытания способны выявить уровень аутофосфорилирования рекомбинантных киназных рецепторов и/или фосфорилирование природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование может быть выявлено, например, применением антитела, специфичного к фосфотирозину в твердофазном иммуноферментном анализе ELISA (аббревиатура от enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ) в анализе методом вестерн-блоттинга. Такие испытания на фосфорилирование для определения тирозинкиназной активности описаны в публикациях Панек и др. (Panek et al.) в *J. Pharm. and Exp. Therapeutics*, том 283, №3, страницы 1433-1444, 1997 год, и Бетли и др. (Batley et al.) в *Life Sci.*, том 62, страницы 1430-150, 1998 год. Подробные описания подходящих испытаний, таких как испытания на фосфорилирование и твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), можно найти в многочисленных публикациях, в том числе в публикации Джей Самбрук и др. (Sambrook, J. et al.) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual («Молекулярное клонирование: лабораторное руководство»), 2е издание, издательство «Коулд Спринг Харбор Лаборатори Пресс (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[048] Кроме того, могут быть использованы методы определения протеиновой экспрессии, при которых протеины, подлежащие измерению, регулируются тирозинкиназной активностью. К этим методам относятся иммуногистохимия ИНС (аббревиатура от immunohistochemistry - иммуногистохимия) для определения протеиновой экспрессии, флуоресцентная *in situ* гибридизация FISH (аббревиатура от fluorescence *in situ* hybridization - флуоресцентная *in situ* гибридизация) для определения генной амплификации, испытания на конкурентное радиолигандное связывание, технологии блоттинга на твердых матрицах, такие как назерн-блоттинг и саузерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой RT-PCR (аббревиатура от reverse transcriptase polymerase chain reaction - полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой), и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) (см., например, публикацию Грандис и др. (Grandis et al.) в *Cancer*, том 78, страницы 1284-1892, 1996 год; публикацию Симидзу и др. (Shimizu et al.) в *Japan J. Cancer Res.*, том 85, страницы 567-571, 1994 год; публикацию Сотер и др. (Sauter et al.)

в Am.J.Path., том 148, страницы 1047-1053, 1996 год; публикацию Коллинз (Collins) в Glia, том 15, страницы 289-296, 1995 год; публикацию Радински и др. (Radinsky et al.) в Clin. Cancer Res., том 1, страницы 19-31, 1995 год; публикацию Петридес и др. (Petrides et al.) в Cancer Res., том 50, страницы 3934-3939, 1990 год; публикацию Хоффманн и др. (Hoffmann et al.) в Anticancer Res., том 17, страницы 4419-4426, 1997 год; публикацию Уикстранд и др. (Wikstrand et al.) в Cancer Res., том 50, страницы 3140-3148, 1995 год.

[049] Для определения ингибирования тирозинкиназ могут быть применены также испытания *in vivo*. Например, ингибирование рецепторных тирозинкиназ может наблюдаться при митогенных испытаниях с использованием клеточных линий, стимулированных рецепторным лигандом в присутствии ингибитора и в его отсутствие. Для анализа на ингибирование рецептора васкулярно-эндо-телиального фактора роста можно использовать, например, эндотелиальные клетки пупочной вены человека (клетки HUVEC) (HUVEC - аббревиатура от human umbilical vein endothelial cells - эндотелиальные клетки пупочной вены человека), простимулированные васкулярно-эндотелиальным фактором роста. Другая методика предполагает испытания на ингибирование роста опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор эпидермального фактора роста или васкулярно-эндотелиальный фактор роста, с использованием, например, человеческих опухолевых клеток, инъектированных мыши (см. патент США №6365157, выданный на имя Рокуэлл и др. (Rockwell et al.)).

[050] Еще одной группой изобретений по настоящей заявке являются способы лечения тирозинкиназа-обусловленных заболеваний и [патологических] состояний у пациентов-млекопитающих посредством введения в организм пациента терапевтически эффективного количества внеклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ и терапевтически эффективного количества внутриклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ. Такое лечение охарактеризованных выше состояний и расстройств включает уменьшение действия тирозинкиназ, предотвращение или ингибирование пролиферации или же частичное снятие симптомов тирозинкиназа-обусловленных заболеваний. Специалист соответствующего профиля способен без труда диагностировать патологическое состояние или расстройство такого рода посредством известных и общеприменимых методов тестирования.

[051] Введение в организм пациента-млекопитающего внеклеточного и внутриклеточного антагонистов рецепторных тирозинкиназ может осуществляться любым способом, обеспечивающим достижение требуемого результата. Введение в организм пациента внеклеточного и внутриклеточного антагонистов рецепторных тирозинкиназ может осуществляться, например, перорально, парентерально (внутривенно или внутримышечно), локально, трансдермально (чрескожно), или посредством ингаляции. Введение в организм пациента внеклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ и внутриклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ может осуществляться как одновременно, так и последовательно. Термин «пациент-млекопитающее» в настоящем описании обозначает преимущественно (но не только) человека, млекопитающих лабораторных животных, млекопитающих животных -домашних любимцев и сельскохозяйственных млекопитающих животных. Вводимое в организм пациента терапевтически эффективное количество того или иного агента - это такое количество вещества (соединения) по предлагаемому изобретению, которое, будучи введенным в организм

пациента-млекопитающего, является достаточным для создания в организме пациента-млекопитающего желаемого терапевтического эффекта, например ингибирования киназной активности.

5 [052] Не намереваясь связывать себя определенной теорией, авторы предлагаемого изобретения предполагают, что к заболеваниям и патологическим состояниям, для
лечения или предотвращения которых могут быть применены способы по
предлагаемому изобретению, относятся заболевания и состояния, связанные с
клеточной пролиферацией, то есть опухолевые заболевания, сердечно-сосудистые
10 заболевания, воспалительные заболевания и другие заболевания пролиферативного
характера. К опухолевым заболеваниям, которые могут лечиться или
предотвращаться способами по предлагаемому изобретению, относятся как
первичные, так и метастатические опухоли, а также резистентные опухоли.
15 Резистентные опухоли это такие опухоли, которые не поддаются или почти не
поддаются лечению только посредством химио-терапевтических агентов, или только
посредством антител, или только посредством радиоактивного облучения, или же при
комбинированном применении этих терапевтических средств. К резистентным
опухолям относятся также такие опухоли, которые по видимости подавляются
20 вышеупомянутыми терапевтическими средствами, однако через некоторое время
рецидивируют - бывает, что даже через пять, а то и через десять и более лет после
прекращения лечения.

[053] Кроме того, к опухолям, которые могут быть подвергнуты лечению
25 посредством внеклеточного и внутриклеточного антагонистов рецепторных
тирозинкиназ по предлагаемому изобретению, относятся также такие опухоли,
которые экспрессируют нормальные уровни рецепторных тирозинкиназ и
характеризуются нормальными уровнями рецепторных тирозинкиназ. Эти
антагонисты применимы также для лечения опухолей со сверхэкспрессией
30 рецепторных тирозинкиназ, например, на уровнях, превышающих нормальные уровни
в 10, 100 или 1000 раз. Причиной такой сверхэкспрессии может быть, например,
рецепторногенная амплификация, повышенная транскрипция или понижение
протеинового метаболизма (повышенная рецепторная устойчивость).

[054] Кроме того, антагонисты по предлагаемому изобретению применимы для
35 лечения опухолей, проявляющих повышенную активность рецепторных тирозинкиназ
по причине дефектов в рецепторной передаче сигнала, например, от мутаций,
являющихся результатом нерегулируемой рецепторной активности. Такие мутантные
рецепторы не могут зависеть от лигандного связывания для стимулирования (см.,
40 например, публикацию Педерсен и др. (Pedersen et al.) в Ann.Oncol., том 12(6),
страницы 745-760, 2000 год (мутация типа III рецептора эпидермального фактора
роста - называемая по-разному: EGFRvIII, de2-7 EGFR или AEGFR - при которой
отсутствует участок внеклеточного лиганда, связывающего домен, закодированный
экзонами 2-7); см. также публикацию Уикстранд и др. (Wikstrand et at.) в Cancer Res.,
45 том 55, страницы 3140-3148, 1995 год.

[055] Например, повышенная активность и сверхэкспрессия рецепторов
эпидермального фактора роста часто связываются с прогрессированием опухоли, а
амплификация и/или сверхэкспрессия рецепторов эпидермального фактора роста на
50 мембранах опухолевых клеток связывается с низкой скоростью реакции на
химиотерапию и резистентностью к радиоактивному облучению. В другом примере
сверхэкспрессия протеина HER2 наблюдается в 25-35% случаев первичного рака
груди, что может быть определено посредством иммуногистохимических анализов

(например, с помощью с помощью тестового набора, выпускаемого на рынок под товарным знаком HercepTest™), а генная амплификация может быть определена с помощью анализов на основе флуоресцентной *in situ* гибридизации (например, с помощью тестового набора, выпускаемого на рынок под товарным знаком

5 PathVysion™) фиксированных опухолевых блоков.

[056] Таким образом, к опухолям, которые экспрессируют рецепторы эпидермального фактора роста и стимулируются лигандом рецепторов эпидермального фактора роста, которые могут быть подвергнуты лечению

10 посредством внеклеточного и внутриклеточного антагонистов по предлагаемому изобретению, относятся карциномы, глиомы, саркомы, аденокарциномы, аденосаркомы и аденомы. Такие опухоли могут возникать практически в любой части тела, в том числе, например, в таких органах и частях тела, как грудь, сердце, легкие, тонкая кишка, толстая кишка, селезенка, почки, мочевого пузыря, голова и шея,

15 яичники, предстательная железа, головной мозг, поджелудочная железа, кожа, кости, костный мозг, кровь, тимус, матка, яички, шейка матки, или печень. К опухолям, для которых установлена сверхэкспрессия рецепторов эпидермального фактора роста, и которые могут быть подвергнуты лечению по предлагаемому изобретению, относятся следующие опухоли (перечень не исчерпывающий): опухоли толстой кишки и опухоли

20 головы и шеи, особенно плоскоклеточная карцинома головы и шеи, такие опухоли головного мозга, как глиобластомы, а также опухоли легких, груди, поджелудочной железы, пищевода, мочевого пузыря, почек, яичников, шейки матки и предстательной железы. В качестве некоторых примеров (которыми объем предлагаемого изобретения не ограничивается) опухолей, для которых наблюдается конститутивно высокая (то есть, нерегулируемая) активность рецепторных тирозинкиназ, могут быть упомянуты следующие опухоли: глиомы, немелкоклеточные легочные карциномы, карциномы

25 яичников и карциномы предстательной железы.

[057] Внеклеточные и внутриклеточные антагонисты рецепторных тирозинкиназ по

30 предлагаемому изобретению применимы также для лечения опухолей, экспрессирующих рецепторы васкулярно-эндотелиального фактора роста, особенно рецептор для домена киназной вставки KDR (аббревиатура от kinase insert domain receptor - рецептор для домена киназной вставки). Такие опухоли характеристически

35 чувствительны к васкулярно-эндотелиальному фактору роста, присутствующему в их окружении, и могут в дальнейшем продуцировать васкулярно-эндотелиальный фактор роста и быть им стимулируемыми по принципу аутокринного стимуляционного контура. Поэтому такой способ эффективен для лечения солидных опухолей или

40 опухолей, не являющихся солидными, то есть без васкуляризации или же пока что без существенной васкуляризации. В качестве примеров солидных опухолей, к которым может быть применено соответствующее лечение, могут быть названы следующие опухоли: карцинома груди, легочная карцинома, карцинома прямой и ободочной

45 кишки, карцинома поджелудочной железы, глиома и лимфома. В качестве примеров опухолей, не являющихся солидными, к которым может быть применено соответствующее лечение, могут быть названы следующие опухоли: лейкоз, множественная миелома и лимфома. В качестве некоторых примеров лейкоза могут быть названы острый миелогенный лейкоз AML (аббревиатура от acute myelogenous leukemia - острый миелогенный лейкоз), хронический миелогенный лейкоз CML

50 (аббревиатура от chronic myelogenous leukemia - хронический миелогенный лейкоз), острый лимфоцитарный лейкоз ALL (аббревиатура от acute lymphocytic leukemia - острый лимфоцитарный лейкоз), хронический лимфоцитарный лейкоз CLL

(аббревиатура от chronic lymphocytic leukemia - хронический лимфоцитарный лейкоз), эритроцитарный лейкоз или моноцитарный лейкоз. В качестве некоторых примеров лимфомы могут быть названы ходжкинская лимфома и неходжкинская лимфома.

5 [058] Внеклеточные и внутриклеточные антагонисты рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению могут быть использованы также для ингибирования ангиогенеза. Стимулирование сосудистого эндотелия рецепторами васкулярно-эндотелиального фактора роста связывается с ангиогенными заболеваниями и васкуляризацией опухолей. Обычно стимулирование сосудистого эндотелия
10 осуществляется паракринно васкулярно-эндотелиальным фактором роста из других источников (например, из опухолевых клеток). Таким образом, способы лечения по предлагаемому изобретению могут быть эффективно применены для лечения пациентов с васкуляризованными опухолями или новообразованиями, или страдающих ангиогенными заболеваниями. К такого рода опухолям и
15 новообразованиям относятся, например, такие злокачественные опухоли и новообразования, как бластомы, карциномы или саркомы, а также опухоли и новообразования с высокой степенью васкуляризации. В качестве примеров видов рака, для лечения которых могут быть применены способы по предлагаемому
20 изобретению, могут быть упомянуты следующие виды рака: рак головного мозга, рак органов мочеполовой системы, рак лимфатической системы, рак желудка, рак почек, рак толстой кишки, рак гортани, рак легких и рак костей. Кроме того, в качестве примеров (которыми объем предлагаемого изобретения не ограничивается) опухолей, для лечения которых могут быть применены способы по предлагаемому изобретению,
25 могут быть упомянуты следующие опухоли: эпидермоидные опухоли, плоскоклеточные опухоли (такие как опухоли головы и шеи), опухоли ободочной и прямой кишки, опухоли предстательной железы, опухоли груди, опухоли легких (в том числе легочная аденокарцинома и мелкоклеточные и немелкоклеточные опухоли
30 легких), опухоли поджелудочной железы, опухоли щитовидной железы, опухоли яичников и опухоли печени.

[059] Способы лечения по предлагаемому изобретению могут быть применены также для лечения васкуляризованных видов рака кожи, включая плоскоклеточную
35 карциному и базальноклеточную карциному, а также такие виды рака кожи, которые могут подвергаться лечению путем подавления роста злокачественных кератиноцитов, например злокачественных кератиноцитов человека. В качестве других примеров видов рака кожи, для лечения которых могут быть применены
40 способы лечения по предлагаемому изобретению, могут быть упомянуты саркома Капоши, новообразования центральной нервной системы CNS (аббревиатура от central nervous system - центральная нервная система) (нейробластомы, капиллярные гемангиобластомы, менингиомы и церебральные метастазы), меланома, желудочно-кишечные и почечные карциномы и саркомы, рабдомиосаркома, глиобластома (в том числе полиморфная глиобластома) и лейомиосаркома.

45 [060] Предлагаемым изобретением также предполагается использование внеклеточных и внутриклеточных антагонистов рецепторных тирозинкиназ для лечения или профилактики патологических состояний, характеризующихся
50 избыточным ангиогенезом, включая, например, васкуляризацию и/или воспалительный процесс, в частности, такие патологические состояния, как атеросклероз, ревматоидный артрит RA (аббревиатура от rheumatoid arthritis), неоваскулярная глаукома, пролиферативная ретинопатия (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), дегенерация желтого пятна, гемангиомы,

ангиофибромы и псориаз. В качестве примеров (которыми объем предлагаемого изобретения не ограничивается) ангиогенных заболеваний, не связанных с новообразованиями, могут быть упомянуты такие заболевания, как ретинопатия, связанная с недоношенностью (ретролентальная фиброплазия), отторжение 5 роговичного трансплантата, инсулинзависимый сахарный диабет, множественный склероз, острая миастения, гранулематозная болезнь, аутоиммунный нефрит, первичный билиарный цирроз печени, острый панкреатит, отторжение аллогенного трансплантата, аллергическое воспаление, контактный дерматит и отложенная 10 сверхчувствительная реакция, воспалительное кишечное заболевание, септический шок, остеопороз, костный артрит, недостатки по части познавательной способности, вызванные воспалением нейронов, синдром Вебера-Ослера, рестеноз, а также грибковые, паразитарные и вирусные инфекции, включая цитомегаловирусные инфекции. Следует заметить, что вышеприведенные перечни заболеваний и 15 патологических состояний носят только иллюстративный характер, и применимость способов лечения по предлагаемому изобретению не ограничивается лечением только вышеназванных заболеваний и патологических состояний, эти способы могут быть применены для лечения любого заболевания или состояния, при котором показано 20 лечение путем регулирования киназной активности.

[061] Кроме того, в объем настоящей заявки включается применение соединений по предлагаемому изобретению *in vivo* и *in vitro* для исследовательских или 25 диагностических технологий, которые хорошо известны в соответствующей отрасли.

[062] Еще одной группой изобретений по настоящей заявке являются 30 фармацевтические композиции, содержащие антагонисты рецепторных тирозиназ по предлагаемому изобретению или фармацевтически приемлемые соли, гидраты или пролекарства таких антагонистов в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Такие фармацевтические композиции могут готовиться как в виде 35 отдельных составов для внеклеточного антагониста рецепторных тирозиназ и для внутриклеточного антагониста рецепторных тирозиназ, так и в виде единых составов, содержащих одновременно и внеклеточный антагонист рецепторных тирозиназ, и внутриклеточный антагонист рецепторных тирозиназ по 40 предлагаемому изобретению.

[063] Фармацевтические композиции по предлагаемому изобретению могут быть 45 приготовлены как в твердой, так и в жидкой форме - в виде растворов или суспензий. Они могут вводиться в организм пациента, например, перорально, парентерально (внутривенно, внутривенно, подкожно или внутримышечно), локально (местное применение или аппликации), трансдермально (чрескожно), а также посредством 50 ингаляции.

[064] Для перорального приема фармацевтические композиции, имеющие в своем 55 составе антагонисты рецепторных тирозиназ по предлагаемому изобретению, могут готовиться, например, в виде жидких лекарственных форм, содержащих инертный разбавитель или усвояемый носитель, или же эти фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде твердой лекарственной формы. В качестве примеров приемлемых лекарственных форм для перорального приема могут 60 быть названы следующие жидкие лекарственные формы: растворы, суспензии, сиропы и эмульсии, и следующие твердые лекарственные формы: таблетки, пастилки, капсулы (включая мягкие желатиновые капсулы) и т.п. Эти лекарственные формы для перорального приема могут быть выполнены в виде лекарственных средств с задержанным высвобождением активных ингредиентов, для чего могут быть

использованы, например, оболочки, обладающие способностью задерживать дезинтеграцию или регулировать диффузию активных ингредиентов. При необходимости в состав фармацевтических композиций по предлагаемому изобретению могут вводиться солюбилизующие агенты.

5 [065] Лекарственные формы, предназначенные для инъекций, в виде которых могут готовиться фармацевтические композиции по предлагаемому изобретению, могут представлять собой стерильные жидкости, которые могут быть, например, растворами, эмульсиями, или суспензиями. Кроме того, эти лекарственные формы для
10 инъекций могут быть и твердыми лекарственными формами, например, стерильными порошками, которые перед инъекцией подвергаются восстановлению, растворению или суспендированию в жидкости. Стерильные растворы для инъекций готовятся путем введением антагонистов рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению, взятых в требуемом количестве, в подходящий растворитель, если
15 требуется, то вместе с другими ингредиентами, о которых говорилось выше, с последующей стерилизацией фильтрованием. В качестве типичных примеров носителей, пригодных для использования в составе фармацевтических композиций по предлагаемому изобретению, выполненных в виде жидких лекарственных форм, могут
20 быть названы стерилизованная вода, физиологический раствор, органические сложные эфиры для инъекций, арахисовое масло, другое растительное масло и т.п. Кроме того, в подходящем для приема виде в состав фармацевтических композиций по предлагаемому изобретению могут вводиться буферные агенты, консерванты и другие добавки. Стерилизация фармацевтических композиций по предлагаемому изобретению
25 может обеспечиваться нагреванием, радиационным облучением, микрофильтрованием, и/или добавлением различных противобактериальных и противогрибковых агентов, таких как, например, парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тимерозал и т.п.

30 [066] Для локального применения фармацевтические композиции, имеющие в своем составе антагонисты рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению, могут готовиться, например, в виде гелей, кремов, мазей или пейнтов (лекарственные вещества в вязком носителе, наносимые кисточкой в горло, на кожу и
35 т.п.). В качестве типичных примеров носителей, пригодных для использования в составе фармацевтических композиций по предлагаемому изобретению, выполненных в виде лекарственных форм для локального применения (аппликаций), могут быть названы гидрофобные или гидрофильные основы, маслянистые или алкогольные жидкости, а также сухие порошки. При приготовлении таких фармацевтических
40 композиций антагонисты рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению могут вводиться в гелевую или матричную основу для аппликации, при этом в случае необходимости может быть обеспечено контролируемое высвобождение активного ингредиента сквозь кожный барьер. Кроме того, по способам, известным в
45 соответствующей отрасли, фармацевтические композиции по предлагаемому изобретению, содержащие антагонисты рецепторных тирозинкиназ, могут быть приготовлены в виде лекарственных форм для ректального применения.

[067] При приготовлении фармацевтических композиций по предлагаемому изобретению в виде лекарственных форм для ингаляции антагонисты рецепторных
50 тирозинкиназ подвергаются растворению или суспендированию в среде подходящего носителя, или же адсорбированию подходящим носителем, так чтобы была обеспечена возможность применения фармацевтической композиции с помощью распылителя аэрозоля или твердого порошка.

[068] Подходящие дозы антагонистов рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению могут быть определены врачом-терапевтом или другим квалифицированным работником из медицинского персонала и зависят от таких факторов, как природа заболевания, подлежащего лечению, способ применения (введения в организм пациента), продолжительность лечения и состояние пациента. Антагонистов рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению могут вводиться в организм пациента так часто, как это необходимо для получения желаемого терапевтического эффекта. Частота введения лекарственного вещества в организм пациента зависит, например, от типа используемой лекарственной формы и заболевания, подлежащего лечению. При инфузионном введении примерные дозы современных внеклеточных антагонистов рецепторов эпидермального фактора роста составляют: для моноклонального антитела ЦЕТУКСИМАБ (cetuximab) 400 мг на 1 м² поверхности кожи в случае ударной дозы и 250 мг на 1 м² поверхности кожи при еженедельной инфузии; для антитела АВХ-EGF 1,5 мг на 1 кг массы тела и 4 мг на 1 кг массы тела в случае ударной дозы, вводимой путем 90-минутной инфузии, и для ТРАСТУЗУМАБ (trastuzumab) 2 мг на 1 кг массы тела при введении путем 30-минутной инфузии в режиме поддерживающей терапии. При пероральном приеме примерные дозы современных внеклеточных антагонистов рецепторов эпидермального фактора роста составляют: для ингибитора тирозинкиназы, выпускаемого на рынок под товарным знаком «Иресса» (Iressa™) 250 мг в сутки; для антагониста, выпускаемого на рынок под товарным знаком «ТАРЦЕВА» (TARCEVA™) 150 мг в сутки и для ингибитора тирозинкиназы, обозначаемого как CI-1033, 560 мг в неделю.

[069] Поскольку предлагаемым изобретением предусматривается терапевтическое лечение, действие которого основывается на двух разных независимых механизмах, при таком лечении обеспечивается повышенное или синергическое ингибирующее воздействие на опухоль по сравнению с применением одного только внеклеточного или одного только внутриклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ. Кроме того, поскольку предлагаемым изобретением предусматривается терапевтическое лечение с использованием внеклеточного антагониста тирозинкиназ и внутриклеточного антагониста тирозинкиназ, терапевтически эффективная доза может быть ниже, чем терапевтически эффективная доза в случае применения одного только внеклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ или одного только внутриклеточного антагониста рецепторных тирозинкиназ.

[070] В отличие от современных методов терапевтического лечения, при которых для подавления опухолевого роста требуется непрерывное введение доз определенного агента, комбинированная терапия по предлагаемому изобретению позволяет с той же целью вводить дозы внеклеточного и внутриклеточного антагонистов рецепторных тирозинкиназ в режиме чередования. Разумеется, обе терапии (то есть введение того и другого антагонистов рецепторных тирозинкиназ) могут осуществляться одновременно. Но в альтернативном варианте введение этих антагонистов рецепторных тирозинкиназ может осуществляться поочередно. Кроме того, возможно циклическое осуществление терапии тем и другим антагонистом рецепторных тирозинкиназ. Таким образом, в течение некоторого периода времени антагонисты рецепторных тирозинкиназ обоих видов могут применяться конкурентно, а затем может применяться только какой-нибудь один из этих антагонистов рецепторных тирозинкиназ. Разумеется, могут применяться любые комбинации и любой порядок терапевтического лечения.

[071] Еще одной группой изобретений по настоящей заявке предусматривается применение внеклеточного и внутриклеточного антагонистов рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению в комбинации с другими терапевтически активными веществами, а также применение способов лечения по предлагаемому изобретению в сочетании с другими терапевтическими практиками. Способы лечения по предлагаемому изобретению могут сочетаться с любыми терапевтическими практиками, известными в соответствующей отрасли.

[072] Внеклеточный и внутриклеточный антагонисты рецепторных тирозинкиназ по предлагаемому изобретению могут применяться в комбинации, например, с одним или более антинеопластических агентов (см., например, патент США №6217866, выданный на имя Шлессинджер и др. (Schlessinger et al.) («Антитела против рецепторов эпидермального фактора роста в комбинации с антинеопластическими агентами») (Anti-EGFR antibodies in combination with antineoplastic agents)); и патентную заявку США серийный номер 09/312.286 на имя Ваксал и др. (Waksal et al.) («Антитела против рецепторов эпидермального фактора роста в комбинации с радиоактивным облучением») (Anti-EGFR antibodies in combination with radiation)). Способы лечения по предлагаемому изобретению могут сочетаться с любыми антинеопластическими химиотерапевтическими агентами, а также с радиоактивным облучением, применяемым в качестве антинеопластической терапии. В качестве примеров применимых химиотерапевтических агентов могут быть упомянуты следующие химиотерапевтические агенты (перечень не исчерпывающий): цисплатин, доксорубицин, паклитаксель, иринотекан (СРТ-11), топотекан и оксалиплатин, а также их комбинации. Когда в качестве антинеопластического фактора используется радиоактивное облучение, источник этого радиоактивного облучения по отношению к пациенту, получающему такое терапевтическое лечение, может быть как внешним (тогда говорят о терапии внешним радиоактивным облучением EBRT (аббревиатура от external beam radiation therapy - терапия внешним радиоактивным облучением)) или внутренним (тогда говорят о близкофокусной лучевой терапии или брахитерапии BT (аббревиатура от brachytherapy - близкофокусная лучевая терапия или брахитерапия)). Доза применяемого антинеопластического агента/фактора зависит от многих факторов, в том числе, например, от типа антинеопластического агента, от типа и стадии опухоли, подлежащей лечению, от способа применения антинеопластического агента/фактора. Следует особо отметить, однако, что объем предлагаемого изобретения не ограничивается какими-либо конкретными дозами антинеопластических агентов/факторов.

[073] Кроме того, любой из предусматриваемых предлагаемым изобретением антагонистов рецепторных тирозинкиназ - как внеклеточный, так и внутриклеточный - может применяться в комбинации с одним или более из подходящих адьювантов, таких как, например, цитокины (например, интерлейкин-10 и интерлейкин-13 (IL - аббревиатура от interleukin - интерлейкин) (см., например, публикацию Ларриве и др. (Larrivee et al.) в Int'l J.Mol.Med., том 5, страницы 447-456, 2000 год).

[074] Цель вышеприведенного описания состояла в том, чтобы всего лишь проиллюстрировать предлагаемое изобретение, но не ограничить его объем. Для специалистов соответствующего профиля очевидны возможные модификации раскрытых выше вариантов осуществления предлагаемого изобретения, которые должны быть также включены в его объем. Кроме того, все источники, на которые были даны ссылки в настоящем описании, включаются в настоящую заявку по ссылке

во всей их полноте.

Формула изобретения

- 5 1. Способ ингибирования рецептора фактора эпидермального роста (EGFR) в организме пациента-млекопитающего, включающий введение в организм этого пациента-млекопитающего внеклеточного антагониста EGFR и внутриклеточного антагониста EGFR.
- 10 2. Способ по п.1, применяемый для терапии опухолевого роста или ангиогенеза у пациента-млекопитающего.
3. Способ по п.1 или 2, в котором внеклеточным антагонистом EGFR является ЦЕТУКСИМАБ, АВХ-EGF, EMD 72000, h-R3, или Y10.
- 15 4. Способ по любому из пп.1 или 2, в котором внутриклеточным антагонистом EGFR является соединение ZD1939 или соединение OSI-774.
5. Способ по любому из пп.1 или 2, дополнительно включающий введение в организм пациента антинеопластического агента.
6. Способ по п.3, дополнительно включающий введение в организм пациента антинеопластического агента.
- 20 7. Способ по п.4, дополнительно включающий введение в организм пациента антинеопластического агента.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая внеклеточный антагонист рецептора фактора эпидермального роста EGFR и внутриклеточный антагонист EGFR.
- 25 9. Фармацевтическая композиция по п.8, в которой внеклеточным антагонистом рецептора фактора эпидермального роста EGFR является ЦЕТУКСИМАБ, АВХ-EGF, EMD 72000, h-R3, или Y10.
10. Фармацевтическая композиция по п.7, в которой внутриклеточным антагонистом EGFR является ZD1939 или OSI-774.
- 30 11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.8-10, дополнительно содержащая антинеопластический агент.

35

40

45

50