

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393255 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.16

(51) Int. Cl. A61K 31/496 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.18

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ПРОТИВ РАКА, РЕЗИСТЕНТНОГО К ИНГИБИТОРУ PARP

(31) 10-2021-0064278; 10-2022-0060706

(72) Изобретатель:

(32) 2021.05.18; 2022.05.18

Чха Хен Чу, Ли Чанг Сеок, Хан Сан У,
Ким Джон (KR)

(33) KR

(86) PCT/KR2022/007115

(74) Представитель:

(87) WO 2022/245131 2022.11.24

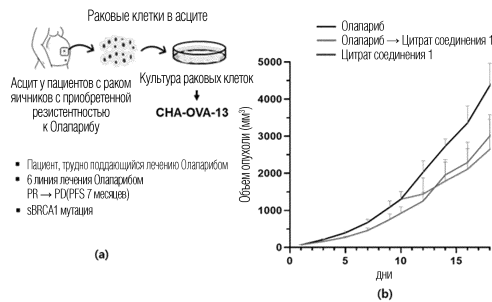
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ОНКОНИК ТЕРАПЬЮТИКС ИНК.
(KR)

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или профилактики солидного рака у пациента, резистентного к ингибитору PARP. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может эффективно уменьшить размер опухоли у пациента с резистентностью к ингибитору PARP.

Противоопухолевое действие цитрата соединения 1 в модели PDX, трудно поддающейся лечению Олапарибом.



A1

202393255

202393255

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579461EA/042

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ПРОТИВ РАКА, РЕЗИСТЕНТНОГО К ИНГИБИТОРУ PARP

Область техники

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент Кореи № 10-2021-0064278, поданной 18 мая 2021 г., все содержание которой включено в настоящий документ как часть настоящего описания.

Настоящее изобретение относится к противораковому терапевтическому агенту, который можно использовать для лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP.

Уровень техники

Накопление мутаций ДНК известно как одна из типовых причин рака. Млекопитающие растут и развиваются из одной клетки, оплодотворенной яйцеклетки, посредством бесконечного процесса клеточного деления, и в этом процессе неизбежно происходят мутации в ДНК (далее называемые «повреждением ДНК»). Однако повреждение ДНК восстанавливается с помощью различных механизмов репарации ДНК, таких как гомологичная рекомбинация (HR) или негомологичное соединение концов (NHEJ). В каждом механизме репарации ДНК участвуют различные типы белков, и если в некоторых из этих белков происходят мутации, возникают проблемы в механизме репарации ДНК, тем самым увеличивая вероятность рака в от нескольких до сотен раз. В общем, когда функция гомологичной рекомбинации теряется, геном становится нестабильным, что вызывает различные генетические изменения и в конечном итоге вызывает опухоли.

Гены BRCA1/2, участвующие в репарации поврежденной ДНК, представляют собой гены, подавляющие онкогенез. Известно, что, когда в гене BRCA1/2 возникает мутация и его функция снижается, поврежденная ДНК не восстанавливается должным образом, и повреждения ДНК накапливаются, вызывая рак. Это называется дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD). Рак молочной железы и яичников, связанный с мутациями гена BRCA1/2, хорошо известен как опухоли с дефицитом гомологичной рекомбинации. В частности, известно, что вероятность развития рака молочной железы или яичников увеличивается до 80% и 60% у женщин с мутациями гена BRCA1/2, соответственно. Однако известно, что мутация гена BRCA1/2 связана не только с вышеупомянутыми раками молочной железы и яичников, но также с раком желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, желчного пузыря, желчевыводящих путей и колоректального рака.

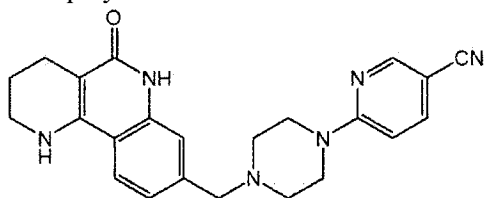
Белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP) представляет собой белок, необходимый для исправления ошибок, которые неизбежно возникают во время репликации ДНК, и представляет собой фермент, который активируется путем распознавания поврежденной ДНК в ядре, и затем активирует белки, связанные с

репарацией ДНК, через пост- трансляционный процесс (PARрилирование). Хотя на данный момент известно 17 семейств PARP, только PARP1/2 был идентифицирован как фермент репарации ДНК, обладающий активностью поли(ADP-рибозилирования), и известен как фермент, необходимый для выживания клеток.

Известно, что опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации проявляет чувствительный ответ на повреждение ДНК, вызванное ингибиторами PARP. Таким образом, ингибиторы PARP имеют большой потенциал в клинической практике в качестве средств лечения рака. Фактически, ингибиторы PARP, такие как олапариб (Lynparza™), рупапариб (Rubraca™), нирапариб (Zejula™) и талазопариб (Talzenna™) назначают пациентам с раком яичников, молочной железы или простаты, которые генетически имеют мутацию BRCA1/2 (мутацию зародышевой линии). В частности, нирапариб используется в качестве агента для поддерживающей терапии рецидивирующего эпителиального рака яичников, серозного рака яичников высокой степени злокачественности (включая рак фаллопиевых труб или первичный рак брюшины) и подобных, которые полностью или частично отвечают на противораковую химиотерапию на основе платины.

6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрил, разработанный как ингибитор PARP, имеет структуру Формулы I ниже. Соединение Формулы I ниже или его фармацевтически приемлемая соль демонстрируют ингибирующую активность не только в отношении PARP1/2, но также в отношении танкиразы 1/2. Известно, что танкираза участвует в митозе, который тесно связан с сигнальным путем Wnt/ β -катенин, процессом репарации ДНК и клеточным циклом. Кроме того, танкираза 1/2 ADP-рибозилирует TRF-1, действуя как положительный регулятор длины теломеры, обеспечивая удлинение теломеры за счет теломеразы. Кроме того, ожидается, что соединение Формулы I ниже или его фармацевтически приемлемая соль будут оказывать терапевтический эффект на рецидивирующий эпителиальный рак яичников, серозный рак яичников высокой степени злокачественности и т.д., которые полностью или частично отвечают на противораковую химиотерапию на основе платины.

<Формула I>



Помимо потенциального или ожидаемого применения различных ингибиторов PARP в качестве таргетных терапевтических агентов для лечения рака, ингибиторы PARP, включая олапариб, имеют высокую врожденную/приобретенную степени резистентности или рефрактерности, как и другие противораковые лекарственные средства. Поскольку соотношение лекарственной резистентности к опухоли с дефицитом гомологичной

рекомбинации увеличивается, исследования по этому вопросу проводятся, но существенного прогресса пока не достигнуто.

Кроме того, неизвестно, может ли соединение Формулы I лечить солидный рак, резистентный к другим противораковым лекарственным средствам, отличным от Формулы I, в частности, солидный рак, резистентный к ингибиторам PARP, используемым в существующих стандартных методах лечения.

На этом фоне, авторы настоящего изобретения изучали противораковые агенты, которые можно использовать при лечении пациентов, проявляющих резистентность к ингибиторам PARP, с различных точек зрения. В результате, настоящее изобретение было завершено путем подтверждения того, что соединение Формулы I по настоящему изобретению уменьшает размер опухоли у пациентов, резистентных к существующим ингибиторам PARP (таким как олапариб).

[Документы известного уровня техники]

[Патентные документы]

1. Патент Кореи с регистрационным № 10-1136702 (Дата выдачи: 20.04.2012)
2. Патент Кореи с регистрационным № 10-1146806 (дата выдачи: 22.05.2012)
3. Патент Кореи с регистрационным № 10-1837047 (дата выдачи: 03.09.2018)

Описание

Техническая проблема

Целью настоящего изобретения является предоставление фармацевтической композиции, содержащей 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрил или его фармацевтически приемлемую соль в качестве композиции для лечения солидного рака у пациента, резистентного к ингибиторам PARP.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление способа лечения солидного рака у субъекта путем введения 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрила или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, имеющему резистентность к ингибиторам PARP.

Еще одной целью настоящего изобретения является предоставление 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрила или его фармацевтически приемлемой соли для применения при лечении солидного рака у пациентов, резистентных к ингибиторам PARP.

Техническое решение

Для достижения вышеуказанной цели, настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрил или его фармацевтически приемлемую соль для лечения солидного рака у пациентов, резистентных к ингибиторам PARP.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ингибитор PARP может

быть по меньшей мере одним из олапариба, рукапариба, нирапариба и талазопариба, но не ограничен ими.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может иметь мутацию BRCA1/2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может иметь мутацию BRCA1/2 зародышевой линии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может иметь соматическую мутацию BRCA1/2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может быть пациентом, который имеет мутацию BRCA1/2, и первоначально отвечал на ингибиторы PARP, но приобрел резистентность во время лечения и не отвечает на ингибиторы PARP, или у которого произошел рецидив рака.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может быть пациентом с мутацией BRCA1/2, который не отвечает на ингибиторы PARP.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может быть пациентом, у которого нет мутации BRCA1/2, и который ранее не отвечал на ингибиторы PARP или у которого произошел рецидив рака.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, солидный рак может представлять собой рак яичников, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак желчных путей или рак желудка, о которых известно, что они вызваны мутацией BRCA1/2, но не ограничен ими.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, солидный рак может иметь форму прогрессирующего солидного рака, рецидивирующего солидного рака или метастатического солидного рака.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, если солидный рак представляет собой рак яичников, это может быть прогрессирующий рак яичников, рецидивирующий рак яичников, серозный рак яичников высокой степени злокачественности (включая рак фаллопиевых труб или первичный рак брюшины), и в случае метастатического рака яичников, первичным раком которого является рак яичников, это может быть рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак желчных путей, рак желудка, рак печени или рак легких, но не ограничен ими.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, фармацевтически приемлемая соль 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила может представлять собой цитрат.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрил или его фармацевтически приемлемую соль для лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибиторам PARP.

Кроме того, настоящее изобретение

предоставляет способ лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP, путем введения эффективного количества 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, настоящее изобретение

предоставляет применение 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP.

Преимущественные эффекты

Поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрил или его фармацевтически приемлемую соль, может эффективно уменьшать размер опухоли у пациента с солидным раком, резистентным к ингибиторам PARP, его можно с пользой использовать для лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибиторам PARP.

Описание чертежей

На ФИГ. 1 представлен чертеж, показывающий результаты анализа противоракового эффекта цитрата соединения Формулы I настоящего изобретения (Пример 2),

На ФИГ. 2 представлен чертеж, показывающий экспериментальные результаты ингибирования активации сигнального пути Wnt цитратом соединения Формулы I настоящего изобретения (Пример 4),

На ФИГ. 3 представлен чертеж, показывающий противораковый эффект цитрата соединения Формулы I по настоящему изобретению, оцененный с использованием модели ксенотрансплантата (Пример 5), и

На ФИГ. 4 представлен чертеж, показывающий противораковый эффект цитрата соединения Формулы I по настоящему изобретению, оцененный с использованием модели ксенотрансплантата (Пример 6).

Лучший вариант осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

При описании и заявлении конкретных признаков настоящего описания, следующие термины будут использоваться в соответствии с определениями, изложенными ниже, если не указано иное.

Следует понимать, что хотя некоторые аспекты в настоящем документе описаны в сочетании с термином «состоящий из», также предусмотрены другие аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Термин «фармацевтически приемлемое» означает вещество, которое приемлемо для пациентов с фармакологической/токсикологической точки зрения в том, что касается

композиции, состава, безопасности и подобных, и «фармацевтически приемлемый носитель» относится к среде, которая не мешает эффекту биологической активности активного ингредиента(ов) и не токсична для субъекта при введении.

Термин «резистентность» относится к случаю, когда лекарственное средство не дает желаемого ответа (противораковый эффект). В частности, в настоящем изобретении это означает охват всех случаев, когда лекарственное средство не вызывает ответ с самого начала (рефрактерность), и когда рецидив возникает с определенного момента после первоначального ответа на лекарственное средство (случаи, когда размер ракового поражения сначала уменьшается, затем рак рецидивирует и увеличивается в размерах; приобретенная резистентность), несмотря на стандартную терапию ингибиторами PARP. В настоящем документе «резистентность» и «толерантность» могут использоваться взаимозаменяемо.

Термин «пациент», или «субъект», или «индивидуум» относится к организму, страдающему от состояния, заболевание которого можно лечить введением фармацевтической композиции по настоящему изобретению, такого как солидный рак, и включает как людей, так и животных. Примеры субъекта включают, но не ограничены ими, млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, коров, свиней, собак, кошек и т.д.), и, предпочтительно, людей. Кроме того, «пациент», или «субъект», или «индивидуум» в настоящем изобретении включает пациента с солидным раком, резистентным к ингибиторам PARP.

Термин «мутация BRCA1/2» относится к мутации BRCA1 и/или BRCA2 и относится к встречающейся в природе мутации в одном или нескольких сайтах генов BRCA1 и BRCA2. Следовательно, мутация может произойти в любом гене, выбранном из генов BRCA1 и BRCA2, или мутация может произойти в обоих генах, и мутация может произойти в одном сайте или в двух или более сайтах каждого гена.

Как упоминалось выше, ингибиторы PARP продемонстрировали большой потенциал в клинической практике в качестве таргетной терапии опухолей с дефицитом гомологичной рекомбинации, но известно, что они имеют высокую скорость приобретения врожденной или приобретенной резистентности. Существуют различные механизмы, объясняющие причину: i) увеличение эффлюкса лекарственного средства за счет увеличения транспортера ABC, ii) активация цепи PAR, iii) реактивация механизма гомологичной рекомбинации за счет мутации генов-супрессоров опухоли, таких как p53, действующих на механизм гомологичной рекомбинации. iv) стабилизация или защита частей репликационной вилки и v) активация сигнального пути Wnt.

Что касается механизма iii) выше, известно, что в процессе гомологичной рекомбинации участвуют различные белки, и у онкологических больных с мутациями BRCA1/2, также одновременно обнаруживаются мутации в других белках, участвующих в процессе гомологичной рекомбинации, таких как p53, ATM, ATR и p51. Поэтому было объяснено, что они могут быть связаны с приобретением резистентности к ингибиторам PARP.

Хотя ингибиторы PARP действуют как специфическая таргетная терапия для пациентов с опухолями с дефицитом гомологичной рекомбинации, они обладают характеристиками легкого приобретения резистентности. Поэтому существует растущий спрос на новые противораковые лекарственные средства, которые можно использовать для лечения пациентов, резистентных к ингибиторам PARP.

Множественная лекарственная резистентность (MDR), одна из причин неудачи противоракового лечения, в последнее время стала важной проблемой в области противоракового лечения. Эта способность обусловлена наличием гена MDR в раковых клетках. Ген MDR1 (ABCB1) представляет собой это ген, который продуцирует вещество под названием Р-гликопротеин (далее именуемый Р-gp). Р-gp представляет собой фермент, который помогает различным видам лекарственных средств проходить через клеточную мембрану и играет роль в выведении их изнутри клетки. При постоянном введении пациентам многих противораковых препаратов возникает лекарственная резистентность, и одним из механизмов резистентности является сверхэкспрессия Р-gp. Следовательно, когда Р-gp сверхэкспрессируется, лекарственные средства, являющиеся субстратами Р-gp, выводятся из клетки с помощью Р-gp и, таким образом, не проявляют лекарственной эффективности. При применении противораковых лекарственных средств, множественная лекарственная резистентность действует как важный ограничивающий фактор, и проводятся различные исследования для преодоления такой множественной лекарственной резистентности. Таким образом, раковые клетки, в которых сверхэкспрессируется Р-gp, могут подавлять функцию Р-gp или преодолевать резистентность, выбирая противораковые препараты, которые не используются в качестве субстратов Р-gp.

Подтверждено, что цитрат соединения Формулы I по настоящему изобретению имеет значительно более низкий коэффициент эффлюкса по Р-gp по сравнению с обычными ингибиторами PARP. Следовательно, его можно с пользой применять для лечения пациентов, резистентных к ингибиторам PARP.

Сигнальный путь Wnt вовлечен в эмбриональное развитие, тканевый гомеостаз и различные заболевания. Сверхактивная передача сигналов вызывает накопление β -катенина, который транслоцируется в ядро и способствует транскрипции онкогенов и росту клеток. Соответственно, предпринимаются усилия по разработке терапевтических агентов, блокирующих сигнальный путь Wnt.

Недавние исследования показали, что механизм резистентности ингибиторов PARP связан с сигнальным путем Wnt. То есть, ингибиторы PARP активируют сигнальный путь Wnt, и известно, что резистентность возникает за счет активации сигнального пути Wnt. Следовательно, резистентность к ингибиторам PARP можно преодолеть путем подбора противораковых лекарственных средств, способных блокировать сигнальный путь Wnt в раковых клетках, приобретших резистентность к ингибиторам PARP.

Было обнаружено, что цитрат соединения формулы I по настоящему изобретению ингибирует путь передачи сигнала Wnt. Следовательно, его можно с пользой применять

для лечения пациентов, резистентных к ингибиторам PARP.

В настоящем изобретении было обнаружено, что когда пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP, лечили 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрилом (соединением Формулы I) или его фармацевтически приемлемой солью, размер солидного рака уменьшался.

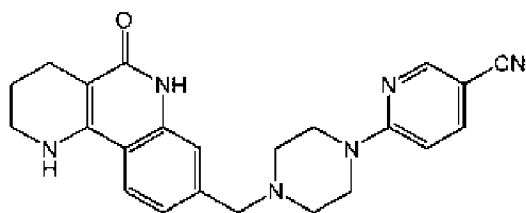
Этот факт можно подтвердить, например, с помощью теста, в котором клеточные линии, резистентные к ингибиторам PARP (олапарибу, рупарфибу, нирапарибу или талазопарибу) или первичные клетки (клетки CHA-OVA-13), выделенные из рака (например, рака яичников) пациентов, резистентных к ингибиторам PARP, обрабатывают соединением Формулы I или его фармацевтически приемлемой солью. В частности, после выбора клеточной линии, резистентной к ингибиторам PARP, среди положительных по мутации BRCA клеточных линий рака яичников или рака молочной железы, таких как HCC1937, SNU-251, BT474 и SNU-119 (например: значение IC_{50} составляет 50 мкМ или выше), может быть подтверждено, что гибель клеток происходит посредством теста, в котором линию клеток обрабатывают соединением Формулы I или его фармацевтически приемлемой солью.

Кроме того, механизм противораковой активности соединения Формулы I может быть подтвержден посредством эксперимента по подтверждению уровня экспрессии белков, связанных с апоптозом, гомологичной рекомбинацией и трансдукцией сигнала, таких как pATR, pCHK1, pAKT, танкираза, расщепляемая каспаза 3, расщепленный белок PARP в клеточных линиях, резистентных к ингибитору PARP, в которых апоптоз происходит при обработке соединением Формулы I или его фармацевтически приемлемой солью.

Этот механизм также может быть подтвержден результатами клинических испытаний на таргетных животных моделях, которым трансплантированы клеточные линии, резистентные к ингибитору PARP, и фактических больных раком, резистентных к ингибиторам PARP.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую соединение, представленное Формулой I ниже, «6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрилом», или его фармацевтически приемлемую соль для лечения солидного рака у пациентов с резистентностью к ингибиторам PARP.

<Формула I>



Поскольку соединение Формулы I проявляет ингибирующую активность в

отношении PARP1/2, его можно применять в качестве таргетного лечения для пациентов с опухолями с дефицитом гомологичной рекомбинации, и оно представляет собой противораковый агент, способный одновременно ингибировать танкиразу 1/2.

Танкираза участвует в гомеостазе теломеры, передаче сигналов Wnt/ β -катенина, метаболизме глюкозы и развитии клеточного цикла. В частности, Wnt/ β -катенин участвует в процессе транскрипции генов, связанных с раком, и сигнальный механизм Wnt/ β -катенина активируется при различных карциномах, включая рак желудочно-кишечного тракта. Таким образом, сообщалось, что противораковые эффекты достигаются за счет ингибирования передачи сигналов Wnt/ β -катенина при ингибировании танкиразы. Фактически были предприняты попытки разработать ингибиторы танкиразы в качестве противораковых агентов.

Соответственно, соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль может ингибировать PARP1/2 подобно олапарибу, который используется в качестве традиционного стандартного лечения, и дополнительно ингибировать танкиразу. Следовательно, можно видеть, что он действует по механизму, отличному от механизма олапариба и подобных.

В настоящем изобретении, фармацевтически приемлемая соль соединения Формулы I представляет собой полезную кислотно-аддитивную соль, образованную из фармацевтически приемлемой свободной кислоты. Кислотно-аддитивные соли получают обычными методами, например, растворением соединения в избытке водного раствора кислоты и осаждением соли с использованием смешивающегося с водой органического растворителя, такого как метанол, этанол, ацетон или ацетонитрил. То есть, его можно получить путем нагревания равных молярных количеств соединения и кислоты или спирта (например, монометилового эфира гликоля) в воде, затем выпаривания растворителя из смеси и ее сушки или фильтрования с отсасыванием выпавшей в осадок соли.

В настоящее время, в качестве свободной кислоты можно использовать органические кислоты и неорганические кислоты. Неорганическая кислота может включать хлористоводородную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту и подобные. Органическая кислота может включать метансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, уксусную кислоту, трифторуксусную кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту, щавелевую кислоту, бензойную кислоту, винную кислоту, фумаровую кислоту, миндальную кислоту, пропионовую кислоту, лимонную кислоту, молочную кислоту, гликолевую кислоту, глюконовую кислоту, галактуроновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутаровую кислоту, глюкуроновую кислоту, аспарагиновую кислоту, аскорбиновую кислоту, угольную кислоту, ванилиновую кислоту, иодистоводородную кислоту и подобные, но не ограничены ими.

В частности, предпочтительно может быть использован цитрат соединения Формулы I.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в качестве

фармацевтически приемлемой соли соединения Формулы I может быть использован безводный, моногидрат или дигидрат цитрата соединения Формулы I, и может быть использована кристаллическая или аморфная форма или смешанная форма кристаллической и аморфной формы.

Различные формы фармацевтически приемлемых солей соединения Формулы I можно получить способами, известными в данной области техники.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ингибитор PARP, к которому имеет резистентность пациент с солидным раком, включает олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб и подобные, которые представляют собой противораковые лекарственные средства, используемые в стандартном лечении, но не ограничен ими.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ингибитор PARP может представлять собой олапариб.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент с солидным раком может представлять собой пациента с опухолью с дефицитом гомологичной рекомбинации с мутацией BRCA1/2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация BRCA1/2 может представлять собой мутацию зародышевой линии или соматическую мутацию.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может представлять собой пациента, имеющего мутацию BRCA1/2 и первоначально отвечающего на ингибитор PARP, затем приобретающего резистентность в процессе лечения и не отвечающего на ингибитор PARP, или у которого произошел рецидив рака.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может иметь мутацию BRCA1/2, но не отвечать на ингибитор PARP.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пациент может представлять собой пациента, у которого нет мутации BRCA1/2 и который ранее не отвечал на ингибитор PARP или у которого произошел рецидив рака.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, солидный рак может представлять собой прогрессирующий солидный рак, рецидивирующий солидный рак или метастатический солидный рак.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, солидный рак может представлять собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак яичников, прогрессирующий рак яичников, серозный рак яичников высокой степени злокачественности (включая рак фаллопиевых труб или первичный рак брюшины) и рак молочной железы, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, метастазировавший из первичного рака, рак яичников, но не ограничен ими.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, солидный рак может представлять собой рак яичников и метастатический рак, распространившийся из первичного рака яичников.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или один или несколько эксципиентов и/или разбавителей.

Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, но не ограничены ими, твердые вещества и/или жидкости, такие как этанол, глицерин, вода и подобные. Количество носителя в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может находиться в диапазоне от примерно 5% до примерно 99% по массе в расчете на общую массу композиции. Типы фармацевтически приемлемых эксципиентов и разбавителей включают нетоксичные и совместимые наполнители, связующие агенты, разрыхлители, буферы, консерванты, смачивающие агенты, наполнители, антиоксиданты, смазывающие агенты, ароматизаторы, загустители, красители, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы и суспендирующие агенты и т. д., но не ограничены ими. Такие эксципиенты и разбавители включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло, но не ограничены ими. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что можно использовать все другие фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты и разбавители.

Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его соль по настоящему изобретению, может быть составлена в форме пероральных препаратов, таких как таблетки, порошки, гранулы, пилюли, капсулы, суспензии, эмульсии, растворы для внутреннего применения, эмульсии и сиропы, препараты для наружного применения, суппозитории или стерильные растворы для инъекций общепринятым способом, и использована.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть в форме стерильного препарата для инъекций в виде стерильной водной или масляной суспензии для инъекций. Эта суспензия может быть составлена в соответствии с методиками, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов (например, Tween 80) и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе (например, растворе в 1,3-бутандиоле). Приемлемые носители и растворители включают маннит, воду, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла можно удобно использовать в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, можно с пользой использовать в препаратах для инъекций, а также фармацевтически приемлемые натуральные масла (например, оливковое масло или касторовое масло), особенно их полиоксиэтилированные

производные.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить перорально в любой перорально приемлемой форме, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки и водные суспензии и растворы.

Композиция для парентерального введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть приготовлена в форме суппозитория или инъекции для ректального введения. Композиции суппозитория можно приготовить путем смешивания соединения по настоящему изобретению с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной температуре. Такие материалы могут включать, но не ограничены ими, масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоль.

В случае композиции для инъекций, соединение по настоящему изобретению может быть включено в качестве активного ингредиента в обычный наполнитель для инъекции, и путь введения может представлять собой внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, подкожную инъекцию и т.д., но не ограничен ими.

Новое соединение, описанное выше, в фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержится в терапевтически эффективном количестве или профилактически эффективном количестве. Предпочтительная дозировка соединения по настоящему изобретению варьируется в зависимости от состояния и веса пациента, тяжести заболевания, типа лекарственного средства, пути и продолжительности введения, но может быть соответствующим образом выбрана специалистами в данной области техники. Однако для желаемых эффектов, соединение Формулы I по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве от 0,0001 до 1000 мг, от 0,01 до 500 мг, от 0,1 до 300 мг, от 1 до 200 мг или от 50 до 200 мг в день. Его можно вводить один раз или разделить на несколько раз. В композиции по настоящему изобретению, соединение Формулы I может быть составлено в количестве от 0,0001 до 50% по массе в расчете на общую массу композиции.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере один активный ингредиент, демонстрирующий такое же или подобное медицинское действие, в дополнение к соединению, представленному Формулой I, его оптического изомера, его рацемату или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, настоящее изобретение предлагает применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для профилактики или лечения солидного рака, резистентного к ингибиторам PARP.

Соединение, представленное Формулой I, или его фармацевтически приемлемую соль для приготовления фармацевтических препаратов можно смешивать с фармацевтически приемлемыми адьювантами, разбавителями, носителями и т.д., и получать в виде комплексного препарата с другими активными агентами для получения синергического эффекта.

Кроме того, настоящее изобретение предлагает способ профилактики или лечения солидного рака, резистентного к ингибиторам PARP, путем введения эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли млекопитающим, включая человека.

Профилактический или терапевтический способ по настоящему изобретению включает не только лечение самого заболевания до появления симптомов, но также ингибирование или профилактику его симптомов путем введения соединения, представленного Формулой I, или его фармацевтически приемлемой соли. При лечении заболевания, профилактическая или терапевтическая доза конкретного активного ингредиента будет варьироваться в зависимости от природы и тяжести заболевания или состояния, и пути введения активного ингредиента. Дозировка и частота введения будут варьироваться в зависимости от возраста, веса и ответа отдельного пациента. Подходящая схема дозирования может быть легко выбрана специалистами в данной области техники, которые принимают во внимание эти факторы. Кроме того, профилактический или терапевтический способ по настоящему изобретению может дополнительно включать введение терапевтически эффективного количества дополнительного активного агента, пригодного для лечения заболевания, вместе с соединением, представленным Формулой I. Дополнительный активный агент может проявлять синергетический или аддитивный эффект с соединением Формулы I или его фармацевтически приемлемой солью.

Вещества, упомянутые в фармацевтической композиции, применении и способе лечения настоящего изобретения, применяются в равной степени, если они не противоречат друг другу.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть предложена в форме набора, включающего инструкции и подобные.

Если не указано иное, все цифры, использованные в описании и формуле изобретения, независимо от того, указаны они или нет, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином «примерно». Кроме того, точные числовые значения, использованные в описании и формуле изобретения, следует понимать как образующие дополнительные варианты осуществления настоящего описания. Были предприняты усилия для обеспечения точности цифр, приведенных в примерах. Однако любое измеренное число по своей сути может содержать определенные значения ошибок, возникающие из-за стандартного отклонения, обнаруженного в соответствующей методике измерения.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно посредством примеров. Эти примеры предназначены только для более подробного объяснения настоящего изобретения, и специалистам в данной области техники будет очевидно, что объем настоящего изобретения не ограничивается этими примерами в соответствии с сутью настоящего изобретения.

В настоящем изобретении, цитрат соединения Формулы I может быть получен способами, известными в данной области техники, способом, описанным в заявке на

патент Кореи № 10-2021-0064416, или способом, описанным в заявке, поданной в ту же дату, что и настоящее изобретение, в качестве заявки, заявляющей приоритет на основе вышеуказанной заявки. Например, способ получения цитрата соединения Формулы I заключается в следующем.

Препаративный пример 1:

Получение цитрата 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила (цитрата соединения Формулы I)

Метанол (25,7 л) и очищенную воду (25,7 л) добавляют к 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрилу (соединению Формулы I, 7,34 кг, 18,32 моль). Затем туда добавляют лимонную кислоту (5,28 кг, 27,49 моль), растворенную в смешанном растворе 1:1 (22 л) метанола и очищенной воды. После перемешивания в течение 30 минут при температуре от 15 до 25°C температуру повышают до 60°C и перемешивают при температуре от 60 до 70°C в течение 2 часов. После охлаждения до комнатной температуры, смесь фильтруют с получением моногидрата цитрата соединения Формулы I (10,7 кг, 95,8%).

Этанол (2,5 л), ацетон (2,5 л) и изопропанол (2,5 л) добавляют к моногидрату цитрата соединения Формулы I (500 г, 0,82 моля), и затем к нему добавляют очищенную воду (20 мл). После повышения температуры до 55°C, ее перемешивают в течение 4 часов при температуре от 55 до 75°C. После охлаждения до 25°C или ниже, смесь перемешивают в течение 30 минут. Полученное твердое вещество фильтруют с получением цитратного ангидрида соединения Формулы I (470 г, выход 96,7%).

Пример 1: Анализ противоракового действия соединения Формулы I (эксперимент in vitro)

Для анализа противоракового действия цитрата 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила) соединения Формулы I в опухолях с дефицитом гомологичной рекомбинации проводят анализ деления клеток с использованием различных клеточных линий.

В этом анализе используют клеточные линии HCC1937, SNU-251, BT474 и SNU-119 используют в качестве положительных по мутации BRCA линий клеток рака яичников или рака молочной железы, и в качестве положительных по мутации BRCA первичных клеток рака яичников, клеток CHA-OVA-13, выделенных от реальных пациентов с положительным по мутации BRCA раком яичников (первичных клеток рака яичников, показывающих приобретенную резистентность к олапарибу).

Сначала проверяют, представляет ли каждая клетка клеточную линию, резистентную к олапарибу, путем измерения IC₅₀. В настоящее время, клеточные линии с IC₅₀ 50 мкМ или более для олапариба выбраны в качестве резистентных к ингибитору PARP клеточных линий, подходящих для этого исследования.

Следующие эксперименты проводят с использованием различных ингибиторов PARP на резистентной к олапарибу клеточной линии. В частности, каждую клетку суспендируют в культуральной среде, распределяют в 96-луночный планшет и

культивируют в течение 24 часов при 5% CO₂ и 37°C. Затем, олапариб, нирапариб, талазопариб и цитрат соединения Формулы I обрабатывают дозозависимым образом, и реагент МТТ добавляют через 72 часа, и останавливающий буфер (10% SDS) добавляют через 3 часа. После реакции в течение 2-4 часов, измеряют абсорбцию при 595 нм и рассчитывают значение IC₅₀ при концентрации, при которой каждое лекарственное средство ингибирует рост клеток на 50%.

В то же время, чтобы подтвердить механизм апоптоза и механизм противораковой активности клеток, обработанных каждым лекарственным средством, на молекулярном уровне, количество белков, связанных с апоптозом, таких как pATR, pCHK1, pAKT, танкираза, расщепленная каспаза 3 и расщепленный белок PARP, анализируют способом иммуноблоттинга.

Пример 2: Анализ противоракового эффекта (эксперимент in vitro)

Для анализа противоракового эффекта цитрата (6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила соединения Формулы I на клетках BRCA дикого типа и мутационного типа, проводят анализ деления клеток с использованием различных клеточных линий.

(1) Экспериментальный способ

В этом анализе используют клеточные линии рака яичников BRCA дикого типа OVCAR-3, OVCAR-5, SKOV3, NCI/ADR-RES, A2780, A2780 CR (клеточная линия, индуцирующая резистентность к карбоплатину) и OVCA433R (клеточная линия, резистентная к олапарибу) и клеточную линию рака яичников мутационного типа BRCA1, SNU-251. После культивирования указанной выше клеточной линии в культуральной среде (RPMI-1640+10% инактивированной нагреванием FBS+1% антибиотика-антимикотика) в условиях 37°C 5% CO₂, ее удаляют из чашки для культивирования клеток и культивируют в течение ночи в 6-луночном планшете для прикрепления клеток. Цитрат соединения Формулы I, олапариб и нирапариб последовательно разводят от высоких концентраций и обрабатывают при различных концентрациях, и оставшиеся пустые лунки обрабатывают контрольным носителем. На 14 день, обрабатывают кристаллическим фиолетовым для окрашивания колоний живых клеток. После промывки PBS и достаточной сушки при комнатной температуре, количество окрашенных колоний подсчитывают и записывают с помощью микроскопа и невооруженным глазом. Значение IC₅₀ рассчитывают на основе концентрации, способной ингибировать образование колоний на 50% (IC₅₀: ингибирующая концентрация для достижения 50% ингибирования образования колоний) путем преобразования относительного числа колоний в экспериментальной группе в %, когда контрольный носитель предполагают равным 100%.

(2) Результат эксперимента

Результаты эксперимента показаны в Таблице 1 ниже и на ФИГ. 1.

[Таблица 1]

IC ₅₀ ([конц.], нМ)			
Клеточный штамм/	Цитрат соединения	Олапариб	Нирапариб

Лекарственное средство	Формулы I		
SNU-251(mBRCA1)	$0,8526 \pm 0,19$	$465,55 \pm 35$	$1147,6 \pm 279,17$
OVCAR3	$2,0845 \pm 0,01$	$2,39 \pm 0,09$	$72,77 \pm 11,19$
A2780	$3,6 \pm 0,21$	$219,15 \pm 10,82$	$158,9 \pm 10,61$
A2780 CR(Chemo R)	$7,4 \pm 1,28$	$540,9 \pm 32,81$	$306,65 \pm 69,79$
SKOV3	$11,92 \pm 3,59$	$1463,5 \pm 120,92$	$1121 \pm 16,97$
NCI/ADR-RES(Drug R)	$25,68 \pm 6,02$	$756,95 \pm 347,97$	$456,95 \pm 81,95$
OVCAR5	$299,55 \pm 117,45$	$1832 \pm 12,73$	$1310,1 \pm 681,51$
OVCA433R (Ola-R)	11321	53717	НО

Как показано в Таблице 1 и на графике на ФИГ. 1, можно видеть, что цитрат соединения Формулы I ингибирует рост раковых клеток даже при значительно более низкой концентрации, чем олапариб или нирапариб, независимо от мутации BRCA. В частности, в линии клеток NCI/ADR-RES, демонстрирующей резистентность к лекарственному средству из-за сверхэкспрессии эффлюксного насоса лекарственного средства, или в линии клеток A2780-CR, индуцирующей резистентность к карбоплатину, рост рака эффективно ингибируется при значительно более низких концентрациях, чем другие ингибиторы PARP.

Пример 3: Оценка коэффициента эффлюкса по P-гр цитрата соединения Формулы I

P-гликопротеин (P-гр) является одним из транспортеров лекарственного средства, определяющих абсорбцию и эффлюкс различных лекарственных средств. Эти процессы абсорбции и эффлюкса лекарственных средств влияют на концентрацию лекарственного средства в плазме и тканях и, в конечном итоге, на конечный эффект лекарственного средства.

Известно, что соединения с высокой субстратной специфичностью P-гр вызывают снижение накопления лекарственного средства в клетках с множественной лекарственной резистентностью и часто опосредуют развитие резистентности к противораковым лекарственным средствам. Ингибиторы PARP, такие как олапариб, рукапариб, нирапариб и талазопариб, являются известными соединениями с высокой субстратной специфичностью P-гр.

В этом эксперименте авторы сравнивают и оценивают коэффициента эффлюкса цитрата соединения Формулы I в P-гр и олапариба, типового ингибитора PARP, чтобы идентифицировать механизм, по которому цитрат соединения Формулы I демонстрирует превосходные эффекты при лечении рака, резистентного к ингибиторам PARP.

(1) Экспериментальный способ

Исследование проницаемости проводят для измерения коэффициента эффлюкса цитрата соединения формулы I и олапариба (AZD-2281). 200 мкл культуральной среды, в

которой количество клеток CaCO_2 составляет 5×10^4 /лунку на каждую вставку, распределяют на апикальной стороне вставки transwell, имеющей диаметр 6,5 мм в 24-луночном планшете. 800 мкл культурального раствора помещают на базолатеральную сторону лунки планшета так, чтобы нижняя часть вставки погружена в воду. После 21 дня культивирования, культуральную среду вставки и планшета удаляют, цитрат соединения Формулы I разводят в культуральной среде в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ и 50 мкМ, соответственно, и олапариб (AZD-2281) разводят в культуральной среде в концентрации 10 мкМ. 250 мкл каждого разведения наносят на верхнюю часть вставки transwell, и 800 мкл культуры, не содержащей лекарственное средство, добавляют на нижнюю часть (измерение $\text{Papp A} \rightarrow \text{B}$). Для изучения эффекта насоса P-гр, на основу наносят 800 мкл культуральной среды, содержащей ту же концентрацию лекарственного средства, и культуральную среду без лекарственного средства помещают на верхний слой вставки (измерение $\text{Papp B} \rightarrow \text{A}$). Образцы по 100 мкл, взятые из каждого супернатанта или базолатеральной части, анализируют в указанные моменты времени: 0, 30, 60, 120 и 180 минут.

(2) Результат эксперимента

Результаты эксперимента показаны в Таблице 2 ниже.

[Таблица 2]

Лекарство		$\text{Papp A} \rightarrow \text{B}$ ($\times 10^6$ см/с)	$\text{Papp B} \rightarrow \text{A}$ ($\times 10^6$ см/с)	Коэффициент эффлюкса ($\text{B} \rightarrow \text{A} / \text{A} \rightarrow \text{B}$)
Олапариб (10 мкМ)		1,7	44,8	26,35
цитрат соединения Формулы I	1 мкМ	19,8	44,1	2,23
	10 мкМ	18,1	49,9	2,76
	50 мкМ	39,7	41,2	1,04

Примечание) А: апикальная сторона клетки, В: базолатеральная сторона клетки.

Как подтверждено в Таблице 2, обнаружено, что коэффициент эффлюкса цитрата соединения Формулы I составляет примерно 1/10 от коэффициента эффлюкса олапариба, ингибитора PARP субстрата P-гр.

(3) Оценка результата эксперимента

Из приведенных выше результатов эксперимента можно видеть, что цитрат соединения Формулы I по настоящему изобретению не является субстратом P-гликопротеина (P-гр).

Благодаря такому механизму действия, цитрат соединения формулы I, по-видимому, способен преодолевать множественную лекарственную резистентность и демонстрировать лучшие противораковые эффекты, в отличие от ингибиторов PARP, таких как олапариб, рукапариб, нирапариб и талазопариб, которые известны как субстраты P-гр.

В частности, в Примере 2, цитрат соединения Формулы I ингибирует рост раковых

клеток в различных типах клеточных линий рака яичников BRCA дикого типа и клеточных линий рака яичников BRCA мутационного типа даже в концентрациях, значительно более низких, чем концентрации олапариба или нирапариба. Похоже, что механизм действия, связанный с коэффициентом эффлюкса P-gp, также частично способствует этому превосходному эффекту. В частности, согласно результатам Примера 2, цитрат соединения Формулы I в клеточной линии NCI/ADR-RES, которая демонстрирует резистентность к лекарственному средству вследствие сверхэкспрессии эффлюксного насоса лекарственного средства, эффективно ингибирует рост рака при значительно более низких концентрациях, чем другие ингибиторы PARP. Таким образом, считается, что эти результаты эксперимента более четко объясняют, что субстрат соединения Формулы I, отличный от P-gp, частично способствует превосходному противораковому эффекту.

Кроме того, известно, что ингибиторы PARP имеют высокий коэффициент приобретения врожденной или приобретенной резистентности, и в качестве механизма, объясняющего эту причину, известен механизм увеличения эффлюкса лекарственного средства за счет увеличения рецепторов ABC (транспортера ABC).

Таким образом, считается, что механизм действия, связанный со скоростью эффлюкса цитрата соединения Формулы I, теоретически подтверждает тот факт, что соединение Формулы I можно эффективно применять при лечении рака, резистентного к другим ингибиторам PARP, таким как олапариб, рукапариб, нирапариб и талазопариб. И эта логика явно подтверждается результатами эксперимента из Примера 4 (анализ противоракового эффекта - модель ксенотрансплантата), Примера 5 (анализ противоракового эффекта - модель ксенотрансплантата) и Примера 6 (фаза I клинического исследования - NOV140201) ниже.

В заключение, цитрат соединения Формулы I по настоящему изобретению обеспечивает превосходный противораковый эффект с механизмом действия, отличным от механизма эффлюкса таких лекарственных средств, как олапариб, рукапариб, нирапариб и талазопариб, которые являются другими ингибиторами PARP, и обеспечивает превосходное воздействие на рак, резистентный к этим ингибиторам PARP.

Пример 4: Оценка эффективности путем ингибирования сигнальной активности Wnt, связанной с резистентностью к олапарибу

(1) Экспериментальный способ

Анализ по гену-репортеру TOP/FOP-flash люциферазы проводят для измерения активации передачи сигналов Wnt в линии клеток рака яичников PEO1 и линии клеток рака яичников PEO1-OR, которые приобрели резистентность к олапарибу. Что касается клеточной линии с приобретенной резистентностью к олапарибу, клеточную линию PEO1 обрабатывают последовательно от низкой концентрации олапариба (10 нМ) до высокой концентрации 8 мкМ, и выжившую клеточную линию называют PEO1-OR. Анализ по гену-репортеру TOP/FOP-flash люциферазы использует принцип, согласно которому β -катенин, который продуцируется при активации Wnt, перемещается в ядро и связывается с

сайтом промотора TCF/LEF для транскрипции генов, на которые влияет Wnt. Затем этот ген заменяют люциферазой, и он предназначен для измерения степени активации Wnt путем измерения люминесценции, преобразованной не люминесцентным субстратом под действием люциферазы. TOP-flash представляет собой экспериментальную плазмиду, в которой происходит транскрипция люциферазы, поскольку β -катенин может связываться с промоторным участком промотора TCF. FOP-flash используют в качестве плазмиды, контролирующей трансфекцию, для измерения базального уровня флуоресценции, поскольку β -катенин не может связываться с сайтом промотора путем введения мутации в промоторе TCF.

Плазмиды TOP-flash или FOP-flash трансфицируют в PEO1, линию клеток рака яичников, и клеточную линию PEO1-OR, линию клеток рака яичников, которая приобрела резистентность к олапарибу. Трансфицированные клеточные линии PEO1 и PEO1-OR подвергают воздействию контрольного носителя и цитрата соединения Формулы I при 400 нМ, 10 мкМ и 50 мкМ, соответственно, в течение 72 часов трансфекции, затем клетки лизируют и добавляют люциферазный субстрат. Степень люминесценции, исходящей от субстрата, измеряют и регистрируют с помощью ридера флуоресценции.

(2) Результат эксперимента

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 2.

Как показано на левом графике ФИГ. 2, в результате относительного сравнения силы передачи сигналов TOP между линией клеток рака яичника PEO1 и линией клеток рака яичника PEO1-OR, которая приобрела резистентность к олапарибу, клеточная линия PEO1-OR, которая приобрела резистентность к олапарибу, показала интенсивность трансдукции сигнала TOP в 5 раз выше по сравнению с другими клеточными линиями. Эти результаты показывают, что передача сигналов Wnt активируется за счет приобретения резистентности к олапарибу в клеточной линии PEO1-OR.

Кроме того, можно подтвердить, что передача сигнала Wnt снижается пропорционально концентрации цитрата соединения Формулы I по сравнению с контрольной группой, когда клеточную линию PEO1-OR, в которой активирован Wnt, обрабатывают цитратом соединения Формулы I из правого графика ФИГ. 2.

В заключение, из приведенного выше эксперимента, когда линия клеток PEO1 приобретает резистентность к олапарибу, передача сигналов Wnt увеличивается (см. график слева на ФИГ. 2), и эта повышенная передача сигналов снижается пропорционально дозе из-за способности ингибировать танкилазу цитратом соединения Формулы I (см. график справа на ФИГ. 2).

(3) Оценка результата эксперимента

Недавно в исследованиях сообщалось, что механизм резистентности ингибиторов PARP связан с сигнальным путем Wnt. Другими словами, известно, что сигнальный путь Wnt активируется как механизм развития резистентности ингибиторами PARP. Следовательно, резистентность к ингибиторам PARP можно преодолеть путем подбора противораковых лекарственных средств, способных блокировать сигнальный путь Wnt в

раковых клетках, приобретших резистентность к ингибиторам PARP.

В отличие от существующих ингибиторов PARP, таких как олапариб, цитрат соединения Формулы I по настоящему изобретению обладает двойным ингибированием PARP и танкиразы (TNK). То есть известно, что существующие ингибиторы PARP активируют путь передачи сигнала Wnt при развитии резистентности, тогда как цитрат соединения Формулы I по настоящему изобретению эффективно ингибирует передачу сигнала Wnt за счет ингибирующего действия TNK.

Следовательно, из этого факта видно, что цитрат соединения Формулы I по настоящему изобретению можно эффективно применять для лечения раков, которые приобрели резистентность к ингибиторам PARP.

Пример 5: Анализ противоракового эффекта (модель ксенотрансплантата)

Чтобы доказать, что цитрат соединения Формулы I можно применять для лечения солидного рака, который действительно является резистентным к ингибиторам PARP, создают модель ксенотрансплантата с использованием клеток, полученных из положительного по мутации BRCA рака яичников, и изучают эффекты PARP. Сравнивают ингибитор (олапариб) и цитрат соединения Формулы I.

(1) Экспериментальный способ

PDX-GFTP 1016 представляет собой клетку, полученную из первичной ткани пациентки с серозным раком яичников высокой степени злокачественности стадии III и имеющую мутации TP53 и BRCA2. Чтобы облегчить отслеживание этой раковой клетки, экспрессируют зеленый флуоресцентный белок/люциферазу (PDX-1016 GFP/luc) и хирургическим путем вводят его в правый яичник между сумками, и затем колонизацию раковых клеток контролируют в течение 4 недель, перед лечением лекарственным средством. Через 4 недели, повторный рост раковых клеток у мышей, получающих олапариб в дозе 50 мг/кг в течение 28 дней, определяют как резистентную к олапарибу PDX-1016 GFP/luc (Ola-R-GTFP-1016).

Клетки Ola-R-GTFP-1016, резистентные к олапарибу PDX, установленные вышеописанным способом, хирургическим путем переносят над сумкой правого яичника в том же месте, что и исходный рак, в концентрации 1×10^6 клеток/мл, как схематично показано на ФИГ. 3А, и стабилизируют в течение 4 недель.

После вышеуказанных 4 недель стабилизации, на основе потока (фотонов в секунду) собирают визуальные данные, такие как интенсивность света GFP/люциферазы, экспрессируемой раком, посредством визуализации потока *in vivo* (система визуализации спектра *in vivo* IVIS, PerkinElmer), наблюдают распространение рака и рост рака.

В это время, используя визуализацию потока *in vivo*, трансплантированных мышей со схожими темпами роста рака случайным образом делят на контрольную группу (группу лечения носителем) и группу лечения 25 мг/кг цитрата соединения Формулы I, и пероральное введение осуществляют один раз в день. Изменения потока регистрируют каждую неделю, и через 4 недели мышей умерщвляют и противораковую активность измеряют путем измерения объема асцита, объема клеток в асците и количества

метастазов рака в лимфу.

(2) Результат эксперимента

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 3 (В - Е).

На ФИГ. 3В, тот факт, что флуоресценция брюшной полости представлена в виде яркого цвета спектра, указывает на то, что в асците активно происходит пролиферация рака. То есть, на ФИГ. 3В показано, что рост рака эффективно подавляется в группе лечения цитратом соединения Формулы I, по сравнению с контрольной группой (группой лечения носителем).

На графике с ФИГ. 3С, флуоресценцию *in vivo*, зарегистрированную через 2 недели после лечения лекарственным средством, используют в качестве стандарта для базального уровня, и изменение относительной флуоресценции наблюдают посредством визуализации *in vivo* в брюшной полости трансплантированных мышей до 4 недель лечения лекарственным средством.

Из графика на ФИГ. 3С можно увидеть, что рост раковых клеток в группе лечения цитратом соединения Формулы I, значительно ингибирован по сравнению с контрольной группой (группой лечения носителем).

На основании данных, подтверждающих, что лечение цитратом соединения Формулы I ингибирует рост рака более эффективно, чем контрольная группа, подсчитывают количество раковых узелков и количество множественных клеток для определения метастатического потенциала рака.

Как показано на ФИГ. 3D, способность рака к образованию узелков значительно снижена в группе лечения цитратом соединения Формулы I по сравнению с контрольной группой. Кроме того, как показано на ФИГ. 3Е, общее количество клеток, образующихся при асците, значительно уменьшено в группе лечения цитратом соединения Формулы I, по сравнению с контрольной группой.

На основании этих результатов можно подтвердить, что в группе лечения цитратом соединения Формулы I ингибировано образование и метастазирование рака более эффективно, чем в контрольной группе.

Пример 6: Анализ противоракового эффекта (модель ксенотрансплантата)

(1) Экспериментальный способ

СНА-OVA-13 представляет собой первичную клетку, полученную из асцитных клеток больных раком яичников с приобретенной резистентностью к олапарибу и имеющую мутацию BRCA1. Эту СНА-OVA-13 вводят мышам NOD/SCID для увеличения размера исходного рака, и когда он достигает определенного размера, рак удаляют, нарезают на небольшие куски, и затем опухоль трансплантируют в подкожный слой голых мышей, чтобы создать мышиную модель. Когда размер опухоли достигает 80 мм³, мышей с аналогичными размерами опухолей отбирают и случайным образом делят на группу лечения олапарибом и группу лечения цитратом соединения Формулы I.

Затем 50 мг/кг олапариба вводят перорально два раза в день группе лечения олапарибом и 50 мг/кг цитрата соединения Формулы I вводят перорально один раз в день

группе лечения цитратом соединения Формулы I. С двухдневными интервалами, размер опухоли измеряют по ширине и высоте с помощью штангенциркуля и записывают, и объем опухоли рассчитывают по следующему уравнению.

$$\text{Объем} = \left(\frac{4}{3}\right) \pi \times \left(\frac{\text{Длина}}{2}\right)^2 \times \left(\frac{\text{Глубина}}{2}\right)$$

Размер опухоли в группе лечения олапарибом и в группе лечения цитратом соединения Формулы I наблюдают в течение 18 дней. Группу лечения олапарибом случайным образом делят на две группы после лечения лекарственным средством в течение 10 дней, где одна группа продолжает получать олапариб таким же образом в течение 8 дней (группа лечения олапарибом), и в другой группе меняют лекарственное средство на цитрат соединения Формулы I, который вводят перорально один раз в день в дозе 50 мг/кг в течение 8 дней (группа замены олапариб-цитрат соединения Формулы I), чтобы наблюдать влияние на размер опухоли.

(2) Результат эксперимента

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 4. Как показано на графике с ФИГ. 4В, можно подтвердить, что рост опухоли в группе лечения цитратом соединения Формулы I, заметно медленнее, чем в группе лечения олапарибом, при наблюдении в общей сложности 18 дней.

Кроме того, в случае группы замены олапариб-цитрат соединения Формулы I, которую лечат путем замены олапариба цитратом соединения Формулы I через 10 дней после разделения группы лечения олапарибом на две, скорость роста опухоли постепенно замедляется по сравнению с группой лечения только олапарибом, и примерно с 13 дня демонстрируется эффект ингибирования роста опухоли, аналогичный эффекту цитрата соединения Формулы I в группе лечения с одним вариантом лечения.

Эти результаты показывают, что продолжение лечения олапарибом ксенотрансплантатов первичных клеток пациентов, резистентных к олапарибу, не ингибирует рост опухоли, но лечение цитратом соединения Формулы I значительно замедляет рост опухоли.

На основании этих результатов можно подтвердить, что цитрат соединения Формулы I обеспечивает превосходный эффект в ингибировании роста раковой ткани, резистентной к олапарибу.

Пример 7: Клиническое исследование фазы I

Клиническое исследование фазы I проводят для оценки стабильности, переносимости, фармакокинетических и фармакодинамических свойств и эффективности цитрата (6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрил) (6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила соединения Формулы I. Группа пациентов состоит из пациентов в возрасте 19 лет и старше с гистологически или цитологически подтвержденным прогрессирующим солидным раком, трудно поддающимся стандартному лечению, или которые не могут

получить стандартное лечение. Отбирают пациентов, ожидаемый период выживания которых составляет 12 недель или более и у которых надлежащая гематологическая функция и функция печени была подтверждена, например, с помощью общих анализов крови.

Отобранные пациенты предоставляют письменное согласие в соответствии с правилами учреждения и FDA. 22 пациента включены в когорту повышения дозы и 40 пациентов включены в расширенную когорту, получающую выбранную дозу (цитрат 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила). Расширенная когорта, получающая выбранную дозу, получает 50 мг/день, 100 мг/день, 150 мг/день и 200 мг/день.

Пациентов во всех когортах оценивают на предмет безопасности, взятия крови с постоянным интервалом, анализа биомаркеров посредством биопсии (образцов опухоли) и генетического анализа (РВМС крови и образцов опухоли) и ответа опухоли (каждые 6 недель) в соответствии с правилами. Кроме того, последующее наблюдение проводят в соответствии с правилами учреждения и правилами Министерства безопасности пищевых продуктов и лекарственных средств даже после завершения введения.

Среди пациентов, включенных в расширенную когорту, получающую выбранную дозу (150 мг/день), у 64-летней пациентки первоначально диагностирован метастатический рак яичников (стадия 3) и имеются обширные солидные раковые ткани, включая яичники, удаленные хирургическим путем, и она является пациенткой с опухолью с дефицитом гомологичной рекомбинации с мутацией BRCA1 зародышевой линии.

У пациентки наблюдается слабый ответ на различные противораковые лекарственные средства, такие как гемцитабин, цисплатин и паклитаксел, и, в частности, установлено, что она имеет резистентность к олапарибу по увеличению размера оставшейся раковой ткани (поражение-мишень) и нового поражения (прогрессирующего заболевания), которое наблюдается сразу после введения олапариба. Затем в течение 2 месяцев вводят неоплатин, лекарственное средство типа цисплатина, но пациентка не отвечает. После этого, пациентку регистрируют для участия в этом клиническом исследовании, и она начинает принимать только цитрат соединения Формулы I в дозе 150 мг/день, и подтверждают, что размер поражения (солидный рак с метастазами в печень) уменьшается более чем на 30% по сравнению с исходным уровнем по данным периодических КТ во время приема лекарственного средства.

Пример 8: Клиническое исследование фазы II

Клиническое исследование фазы II проводят с целью оценить, можно ли применять цитрат (6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинонитрила) соединения Формулы I для лечения пациентов, резистентных к ингибиторам PARP. Группа пациентов состоит из пациентов в возрасте 19 лет и старше с гистологически или цитологически подтвержденным солидным раком, подтвержденных как положительные по HRD (дефициту гомологичной

рекомбинации). В частности, пациенты представляют собой пациентов с серьезным эпителиальным раком яичников высокой степени злокачественности (2 или 3 степени), раком фаллопиевых труб или первичным раком брюшины, у которых рак рецидивировал или прогрессировал после получения более 2 линий противоракового лечения их опухоли перед участием в этом клиническом исследовании.

Противораковое лечение, в частности, относится к лечению одним или комбинацией гемцитабина, доксорубицина, топотекана, карбоплатина, оксалиплатина, цисплатина, бевацизумаба или ингибитора PARP.

В качестве субъекта выбирают пациентов, ожидаемый период выживания которых составляет 12 недель или более, и у которых надлежащая гематологическая функция, функция почек и функция печени подтверждена, например, с помощью общих анализов крови.

Отобранные пациенты предоставляют письменное согласие в соответствии с правилами учреждения и FDA. К пациентам относятся те, которые в анамнезе лечения демонстрировали чувствительность к препаратам на основе платины, или те, которые демонстрируют чувствительность к препаратам на основе платины, но у которых лечение существующими ингибиторами PARP, такими как олапариб и нирапариб, оказалось безуспешным. В исследование включают примерно 60 пациентов, но это может быть изменено.

Цитрат соединения Формулы I вводят в дозе 100 мг/день, и при необходимости дозу можно корректировать.

Пациентов во всех группах обследуют на предмет оценки безопасности, взятия крови с постоянным интервалом, генетического анализа (РВМС крови и образцов опухоли) и ответа опухоли (каждые 8 недель) в соответствии с правилами. Кроме того, последующее наблюдение проводится в соответствии с правилами учреждения и правилами Министерства безопасности пищевых продуктов и лекарственных средств даже после завершения введения.

Эффективность, безопасность, переносимость, ФК и т. д. могут быть измерены и оценены в ходе этого клинического исследования фазы II.

Эффективность включает терапевтический эффект «цитрата Формулы I по настоящему изобретению» на «пациентов, положительных по мутации HRD, у которых не было успешным лечение существующими ингибиторами PARP и т.д.». Более конкретно, это клиническое исследование фазы II позволяет эффективно уменьшить размер солидного рака у пациентов, у которых лечение существующими ингибиторами PARP оказалось неэффективным.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрил или его фармацевтически приемлемую соль для лечения или профилактики рака у пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что пациент с солидным раком имеет опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD).
3. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что пациент с солидным раком имеет мутацию BRCA1/2.
4. Фармацевтическая композиция по п. 3, где мутация BRCA1/2 представляет собой мутацию зародышевой линии.
5. Фармацевтическая композиция по п. 3, отличающаяся тем, что мутация BRCA1/2 представляет собой соматическую мутацию.
6. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что у пациента с солидным раком нет мутации BRCA1/2.
7. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что ингибитор PARP представляет собой по меньшей мере один ингибитор, выбранный из олапариба, рупапариба, нирапариба и талазопариба.
8. Фармацевтическая композиция по п. 7, отличающаяся тем, что ингибитор PARP представляет собой олапариб.
9. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что солидный рак представляет собой по меньшей мере один рак, выбранный из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, прогрессирующего рака яичников, серозного рака яичников высокой степени злокачественности (включая рак фаллопиевых труб или первичный рак брюшины) и метастатического рака, распространившегося из первичного рака яичников.
10. Фармацевтическая композиция по п. 9, отличающаяся тем, что солидный рак представляет собой рак яичников.
11. Фармацевтическая композиция по п. 9, отличающаяся тем, что солидный рак представляет собой метастатический рак, распространившийся из первичного рака яичников.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемая соль 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрила представляет собой цитрат.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.
14. 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрил или его фармацевтически приемлемая соль для

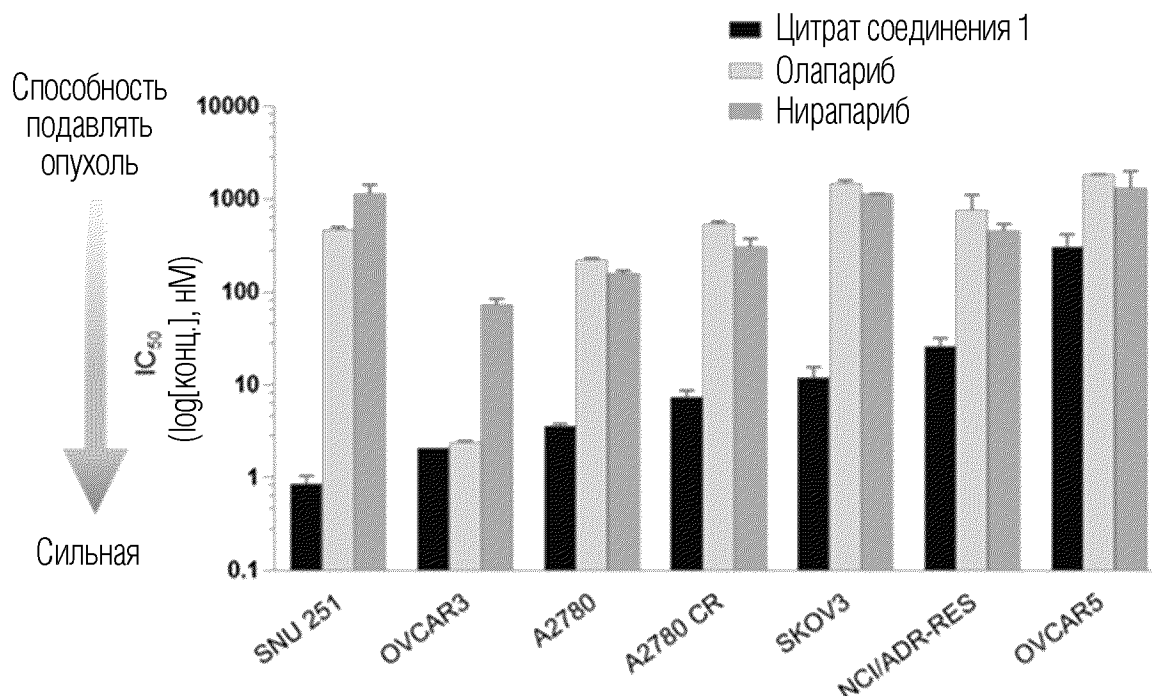
лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP .

15. Способ лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP, путем введения эффективного количества 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

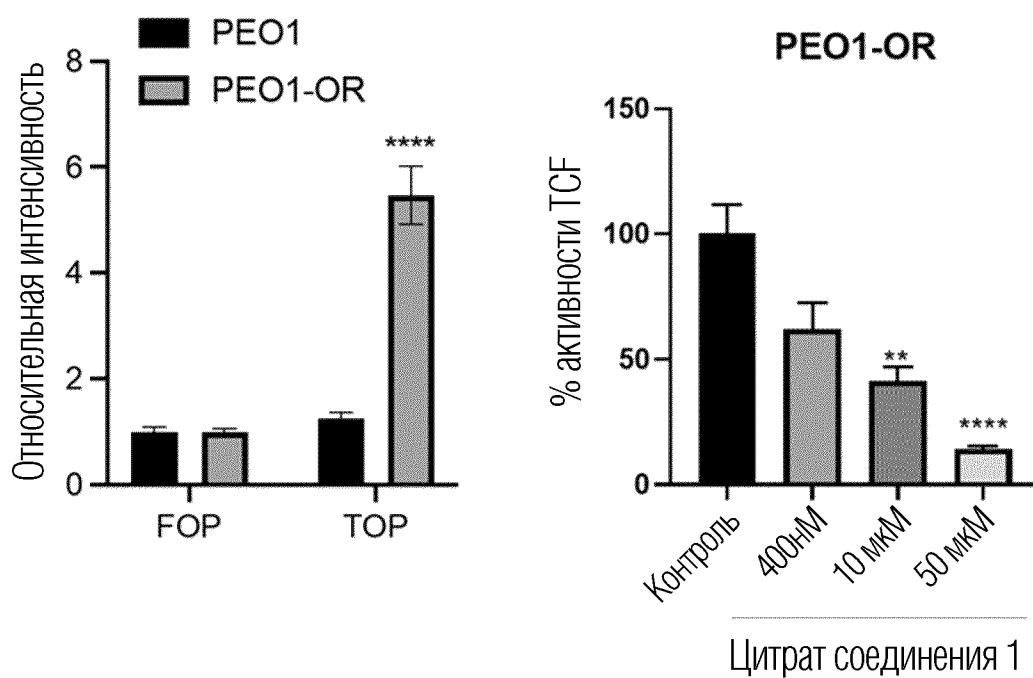
16. Применение 6-{4-[(5-оксо-1,2,3,4,5,6-гексагидробензо[h][1,6]нафтиридин-8-ил)метил]пиперазин-1-ил}никотинитрила или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения пациента с солидным раком, резистентным к ингибитору PARP.

По доверенности

ФИГ. 1

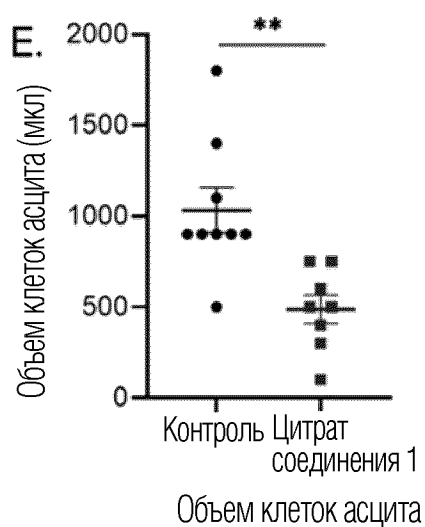
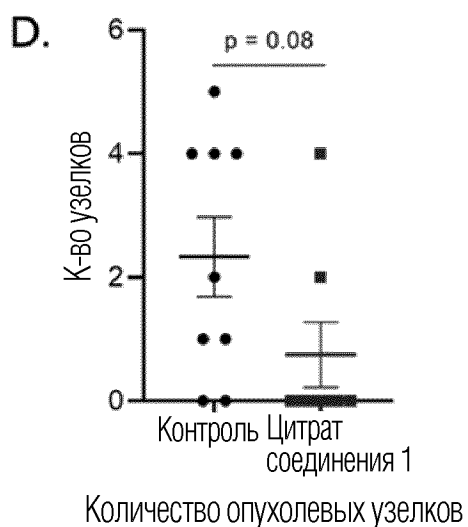
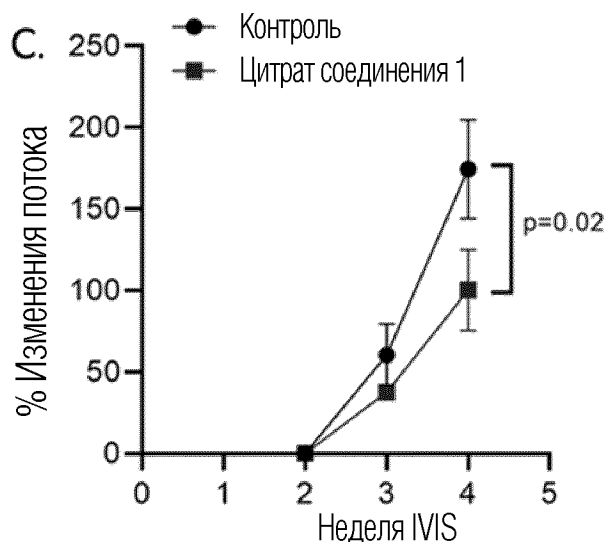
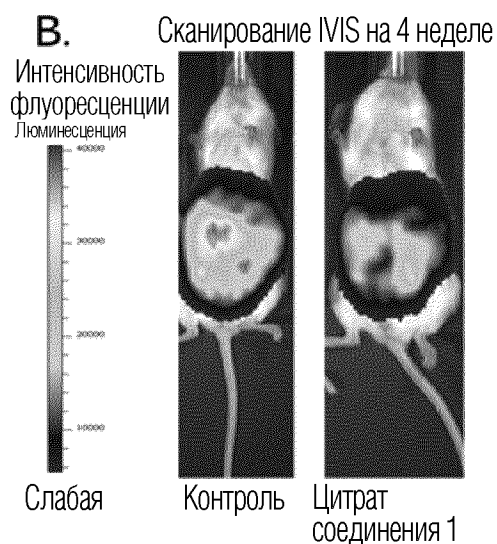
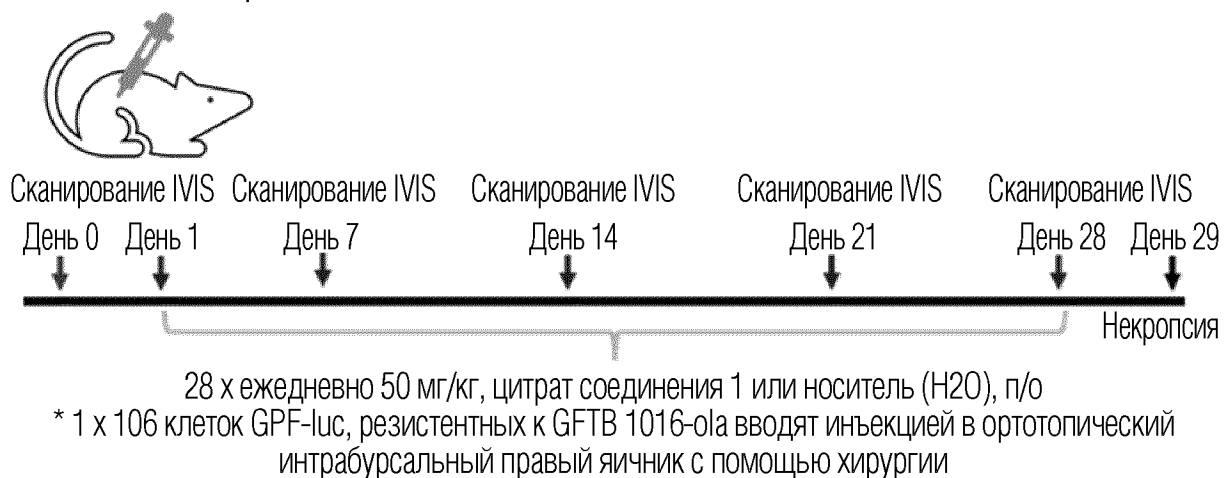


ФИГ. 2



ФИГ. 3

А. Схема эксперимента



ФИГ. 4

Противоопухолевое действие цитрата соединения 1 в модели PDX, трудно поддающейся лечению Олапарибом

