



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011117059/15, 28.09.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.09.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.10.2008 US 61/101,851;
01.10.2008 US 61/101,858

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2012 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 10.06.2014 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO2007131201 A2, 2007-11-15.
WO2007120827 A2, 2007-10-25. WO2008110611
A1, 2008-09-18. WO2006028958 A2, 2006-03-16.
WO2005094864 A2, 2005-10-13. EP1972631 A1,
2008-09-24. RU2005103610 A, 27.08.2005(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.05.2011(86) Заявка РСТ:
EP 2009/062537 (28.09.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/037715 (08.04.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

Марион ДОРШ (US),
Джон Э. МОНАХАН (US),
Майкл Патрик МОРРИССИ (US),
Шифэн ПАНЬ (US),
Джульет УИЛЛЬЯМС (GB)(73) Патентообладатель(и):
НОВАРТИС АГ (CH)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТАГОНИСТОВ SMOOTHENED ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С ПУТЕМ HEDGEHOG НАРУШЕНИЙ

(57) Реферат:

Группа изобретений основана на модуляции путей трансдукции сигналов Hedgehog. Более подробно группа изобретений относится к способам лечения, связанным с Hedgehog раков. В частности, в заявке описаны способы ингибирования состояний аномального роста, которые обусловлены такими фенотипами, как потеря функции Ptc, усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog, усиление по доминантно-негативному типу функции

Smoothened или усиление по доминантно-негативному типу функции Gli, заключающиеся во введении млекопитающему комбинации, включающей ингибиторы Smoothened и ингибиторы Gli или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Группа изобретений позволяет эффективно лечить раки, связанные с Hedgehog. 2 н. и 4 з.п. ф-лы, 4 табл., 2 пр., 9 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011117059/15, 28.09.2009**(24) Effective date for property rights:
28.09.2009

Priority:

(30) Convention priority:
01.10.2008 US 61/101,851;
01.10.2008 US 61/101,858(43) Application published: **10.11.2012 Bull. № 31**(45) Date of publication: **10.06.2014 Bull. № 16**(85) Commencement of national phase: **03.05.2011**(86) PCT application:
EP 2009/062537 (28.09.2009)(87) PCT publication:
WO 2010/037715 (08.04.2010)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

Marion DORSh (US),
Dzhon Eh. MONAKhAN (US),
Majkl Patrik MORRISSI (US),
Shifehn PAN' (US),
Dzhul'et UILL'JaMS (GB)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)(54) **USING SMOOTHENED ANTAGONISTS FOR TREATING HEDGEHOG PATHWAY RELATED DISORDERS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions is based on modulation of Hedgehog signalling transduction pathways. In more detail, the group of inventions refers to methods of treating Hedgehog related cancer. Particularly, the application describes methods of inhibition of abnormal growth conditions caused by such phenotypes, as loss of the Ptch function, dominant-negative intensification of the Hedgehog function, dominant-

negative intensification of the Smoothened function or dominant-negative intensification of the Gli function consisting in administering a combination containing Smoothened inhibitors and Gli inhibitors or phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitors into a mammal.

EFFECT: group of inventions enables treating Hedgehog-related cancers effectively.

6 cl, 4 tbl, 2 ex, 9 dwg

C 2
0 0 2 0 0
2 5 1 9 2 0 0
R UR U
2 5 1 9 2 0 0
C 2

Предпосылки создания изобретения

Путь передачи сигналов (сигнальный путь) Hedgehog (Hh) впервые был выявлен у *Drosophila* в качестве важного регуляторного механизма формирования структуры эмбриона или процесса, посредством которого эмбриональные клетки формируют упорядоченные пространственные структуры дифференцированных тканей (Nusslein-Volhard и др., Nature 287, 1980, сс.795-801). В клетках млекопитающих идентифицировано три гена Hedgehog, а именно Sonic Hedgehog (Shh), India Hedgehog (Ihh) и Desert Hedgehog (Dhh). Гены Hedgehog кодируют секретлируемые белки, которые подвергаются посттрансляционным модификациям, таким как автокаталитическое расщепление и липидная модификация (пальмитоилирование) на N-конце и модификация холестерином на C-конце.

Несущий липидную модификацию на N-конце белок Hedgehog запускает сигнальную активность белкового пути, в результате чего создается коммуникация по типу клетка-клетка посредством «отправки» растворимого белка Hedgehog от сигнальной клетки и получения его отвечающей клеткой. В отвечающих клетках (клетках-репондерах) рецептор Patched (Ptc), имеющий 12 трансмембранных (спиральных) доменов, действует в качестве негативного регулятора передачи сигналов Hh, а имеющий 7 трансмембранных (спиральных) доменов белок Smoothed (Smo) действует в качестве позитивного регулятора передачи сигналов Hh. В состоянии покоя свободный Ptc (т.е. не связанный с Hh) субстехиометрически подавляет активность каскада, индуцируемого Smo (Taipale и др., Nature 418, 2002, с.892), однако при связывании выступающим в качестве лиганда белком Hh подавление Smo ослабляется, и в результате этого сигнальный каскад приводит к активации и ядерной транслокации факторов транскрипции Gli (Gli1, Gli2 и Gli3).

Низлежащие гены-мишени для опосредуемой передачей сигнала Hh транскрипции (расположенные по ходу пути передачи сигналов Hh гены-мишени) включают Wnts, TGF β и Ptc и Gli1, которые представляют собой элементы позитивной и негативной регуляторной петли обратной связи. К генам-мишеням пути передачи сигналов Hh относятся также несколько генов, участвующих в регуляции клеточного цикла и пролиферации, таких как c-myc, циклин D и E.

Известно, что путь передачи сигналов Hh регулирует разнообразные биологические процессы, такие как клеточная пролиферация, дифференцировка и формирование органов, специфическим для ткани и зависящим от дозы образом. При развитии нервных трубок происходит экспрессия Shh на вентральной пластинке, и он регулирует дифференцировку определенных подтипов нейронов, включая двигательные и допаминергические нейроны. Известно также, что Hh регулирует пролиферацию нейронных клеток-предшественников, таких как мозжечковые лаброциты и нервные стволовые клетки. В процессе формирования кишечного тракта для развития поджелудочной железы требуется низкий уровень передачи сигналов Hh, в то время как высокий уровень передачи сигналов Hh блокирует органогенез поджелудочной железы. Известно также, что Hh играет важную роль в пролиферации стволовых клеток и органогенезе кожи, предстательной железы, яичек и костного мозга.

В здоровом организме передача сигналов Hh строго контролируется в процессе клеточной пролиферации, дифференцировки и формирования эмбриональной структуры. Однако аномальная активность пути передачи сигналов Hedgehog, например, обусловленная мутациями, которые конститутивно активируют путь, может иметь патологические последствия. Например, мутации, приводящие к потере функции (мутации типа «loss-of-function») Patched, были выявлены при синдроме Горлина

(наследственный синдром с высоким риском развития рака кожи и головного мозга, известный также как базально-клеточный невус синдром (BCNS)); а мутации, приводящие к усилению по доминантно-негативному типу функций («gain-of-function») Smo и Gli, связаны с базально-клеточной карциномой и глиобластомой. Базально-клеточная карцинома (BCC) представляет собой наиболее распространенную форму рака кожи, которая поражает ежегодно более 90000 американцев.

Было установлено, что конститутивная активация Hh стимулирует онкогенез в случае BCC, медуллобластомы (наиболее распространенный тип опухоли головного мозга у детей), рабдомиосаркомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легких, рака предстательной железы и рака молочной железы. Помимо своей роли в онкогенезе передача сигналов Hh участвует в метастазировании рака предстательной железы. Передача сигналов Hh может играть роль при многих других типах опухолей, и можно ожидать, что будет продолжаться выявление таких связей; в этой области ведутся активные исследования во многих раковых центрах во всем мире.

Для пролиферации таких раковых клеток требуется активация пути Hh, и блокирование путей передачи сигналов Hh часто приводит к ингибированию пролиферации раковых клеток. Так, известно, что антагонист Hh циклопамин и siРНК, являющиеся ингибиторами Gli1, могут эффективно блокировать пролиферацию таких раковых клеток и могут уменьшать размер опухоли, что продемонстрировано в опытах на моделях с использованием ксенотрансплантатов, это позволяет предположить, что антагонисты Hh, применяемые индивидуально или в сочетании с другими агентами, могут являться основой для разработки новых химиотерапевтических схем лечения указанных типов рака. В опытах на животных было установлено, что антагонист Hh циклопамин подавляет метастазирование рака предстательной железы.

Установление того факта, что конститутивная активация Smo приводит к развитию некоторых типов рака (например, BCC), и что Smo может обладать онкогенными свойствами в том случае, если на него не оказывает ингибирующее действие Ptch, позволяет предположить, что антагонисты Smo можно применять в качестве терапевтических средств при лечении указанных нарушений (Stone и др., Nature 384, 1996, с.129). Таким образом, молекулы, которые модулируют активность пути передачи сигналов Hedgehog, например, модулируют активность Smo, можно применять в терапевтических целях.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится в целом к диагностированию и лечению патологий, связанных с путем Hedgehog (которые указаны ниже и обозначены в настоящем описании как «связанное(ые) с Hedgehog нарушение(я)»), которые включают (но не ограничиваясь только ими) развитие опухоли, рак, неоплазию и незлокачественные гиперпролиферативные нарушения, и более конкретно к способам ингибирования онкогенеза, роста опухоли и выживания опухоли с помощью агентов, в отношении которых известно, что они ингибируют путь передачи сигналов Hedgehog и Smo (например, с помощью ингибиторов Smoothened), в сочетании с (I) ингибиторами пути биосинтеза холестерина (например, статинами); (II) ингибиторами Gli и/или (III) ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Ингибиторы Smoothened представляют собой класс соединений, указанных в настоящем описании, и к ним относятся (но, не ограничиваясь только ими) циклопамин, джервин, соединения формулы I (например, соединение формулы (Ia), (Ib) или (Ic)), соединения формулы II, соединения формулы III, любые являющиеся антагонистами Smoothened соединения, конкретно перечисленные в настоящем описании, антитела к Smo, нуклеиновые кислоты,

являющиеся ингибиторами Smo (например, siPHK, являющиеся антагонистами Smo), и другие агенты, являющиеся антагонистами Smoothened, известные в данной области и/или включенные в настоящее описание в качестве ссылки. Ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) также представляют собой класс соединений, указанных в настоящем описании, и включают (но не ограничиваясь только ими) соединения формулы А, а также ингибиторы липидкиназы и являющиеся ингибиторами PI3K нуклеотиды (например, посредством процесса RNAi).

Способы и соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, предназначены для ингибирования активации пути передачи сигналов Hedgehog, например, для ингибирования состояний аномального роста, обусловленных такими фенотипами, как потеря функции Ptch, усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog, усиление по доминантно-негативному типу функции Smoothened или усиление по доминантно-негативному типу функции Gli, и они предусматривают приведение в контакт клетки с комбинацией агентов, в отношении которых известно, что они обладают способностью ингибировать путь передачи сигналов Hedgehog и Smo, например, с ингибиторами Smoothened и ингибиторами биосинтеза холестерина (например, статинами); ингибиторами Gli и/или ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), взятыми в количестве, достаточном для осуществления агонистического воздействия на нормальную активность Ptch, антагонистического воздействия на нормальную активность Hedgehog или антагонистического воздействия на активность Smoothened (например, для реверсии или контроля состояния аномального роста).

Одним из объектов настоящего изобретения являются способы, в которых применяют соединения для ингибирования активации зависящего от Smo пути (например, в том случае, когда Smo активируется в присутствии лиганда Hedgehog). Другой объект настоящего изобретения относится к способам, в которых применяют соединения для ингибирования активации Hedgehog (лиганд)-независимого пути. В конкретных вариантах осуществления изобретения способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для противодействия фенотипическим проявлениям нежелательной активации пути Hedgehog, например, вследствие мутаций, обуславливающих усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog, потерю функции Ptch или усиление по доминантно-негативному типу функции Smoothened, при этом активация может иметь место в присутствии лиганда Hedgehog или без него. Например, способ, предлагаемый в изобретении, может заключаться в том, что приводят в контакт клетку (in vitro или in vivo) с антагонистом Smo, таким как ингибитор Smoothened, в комбинации с ингибиторами пути биосинтеза холестерина (например, статинами), ингибиторами Gli и/или ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), в количестве, которое является достаточным для осуществления антагонистического воздействия на зависящий от Smoothened или не зависящий от Smoothened (т.е. в том случае, когда активируются низлежащие по отношению к Smoothened компоненты) путь передачи сигналов Hedgehog в присутствии лиганда Hedgehog или без него.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам ингибирования синтеза, экспрессии, производства, стабилизации, фосфорилирования, релокализации в клетке и/или активности белка Smo в клетке in vitro или in vivo, которые заключаются в том, что приводят в контакт клетку или интродуцируют в клетку комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы

Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), можно вводить одновременно или последовательно. Например, в некоторых случаях ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) можно вводить после того, как в присутствии ингибиторов Smo уже произошло развитие устойчивых опухолей.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения осуществляют также ингибирование в клетке *in vitro* или *in vivo* белков, которые находятся ниже Smo в пути передачи сигналов Hedgehog (например, Gli). Например, в дополнение к указанному выше ингибированию Smoothened можно ингибировать также синтез, экспрессию, производство, стабилизацию, фосфорилирование, релокализацию в клетке и/или активность белка(ов) Gli, путем приведения в контакт клетки или интродуцируя в клетку комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления изобретения путь Hedgehog может все еще сохранять активность в клетке, несмотря на то, что ее ранее подвергали воздействию антагониста Smoothened (например, как это имеет место в случае устойчивых опухолей), поскольку был активирован низлежащий по отношению к Smo путь (например, Gli). В других вариантах осуществления изобретения клетку предварительно не подвергали воздействию антагониста Smoothened.

Способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для регуляции пролиферации и/или дифференцировки клеток *in vitro* и/или *in vivo*, например, для формирования ткани из стволовых клеток, или для предупреждения роста гиперпролиферативных клеток. В другом конкретном варианте осуществления изобретения в результате приведения клетки в контакт с комбинацией или интродукции в клетку комбинации, включающей ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), осуществляют ингибирование клеточной пролиферации, ингибирование роста и/или выживания опухолевых клеток, и/или ингибирование онкогенеза. Так, еще один конкретный вариант осуществления изобретения относится к способам ингибирования и/или осуществления антагонистического воздействия на путь Hh, заключающимся в том, что применяют комбинацию способов, предлагаемых в изобретении для воздействия на опухолевые клетки. В конкретных вариантах осуществления изобретения клеточная пролиферация, рост и/или выживание опухолевых клеток, и/или онкогенез ассоциированы с устойчивыми опухолями. В других вариантах осуществления изобретения клеточная пролиферация, рост и/или выживание опухолевых клеток, и/или онкогенез ассоциированы с чувствительными опухолями.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения комбинации, предлагаемые в изобретении, можно вводить пациентам, имеющим чувствительные опухоли. Согласно другим конкретным вариантам осуществления изобретения указанные комбинации можно вводить пациентам, пораженным устойчивыми опухолями.

Указанные выше опухолевые клетки, для обработки которых можно применять комбинации, предлагаемые в изобретении, могут быть устойчивыми к апоптозу, могут быть устойчивыми к общепринятым схемам обработки противораковыми лекарственными средствами, и/или могут представлять собой указанные в настоящем описании клетки устойчивых опухолей. Устойчивые опухоли могут возникать, например, в результате генетических изменений, приводящих к реактивации пути Hedgehog,

несмотря на присутствие ингибиторов Smo. Примерами могут служить мутации Smo, которые оказывают влияние на связывание ингибиторов, и/или мутации в низлежащих по отношению к Smo генах, приводящие к реактивации пути Hedgehog (например, *sufu*, *Glil*, *Gli2*). В случае таких устойчивых опухолей и опухолей, которые не погибают при использовании общепринятых схем обработки противораковыми лекарственными средствами, комбинации, предлагаемые в изобретении, могут индуцировать у опухолевых клеток процессы старения, апоптоза или некроза. Введение таких комбинаций может приводить к гибели опухолевых клеток и предупреждению метастазов.

В способах, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять комбинации ингибиторов Smoothened, включенных в состав фармацевтических препаратов, содержащих фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Аналогично этому ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) можно включать в состав фармацевтических препаратов, содержащих также фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. Указанные комбинации можно вводить пациенту с целью лечения состояний, при которых имеет место нежелательная клеточная пролиферация, таких как различные типы рака и/или опухолей (такие как медуллобластома, базально-клеточная карцинома и т.д.), и незлокачественных гиперпролиферативных нарушений. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения указанные комбинации можно вводить пациенту, пораженному чувствительными опухолями. Согласно другим конкретным вариантам осуществления изобретения указанные комбинации можно вводить пациенту, пораженному устойчивыми опухолями.

Другие объекты изобретения относятся к способам диагностирования, предупреждения и/или лечения клеточных истощений, нарушений и/или дисфункций; гиперпластических, гиперпролиферативных и/или злокачественных болезненных состояний; и/или метастазов опухолевых клеток у млекопитающего, которое отличается тем, что в его организме присутствует и/или экспрессируется ген или продукт гена Smo (например, белок Smo), заключающимся в том, что млекопитающему вводят комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K).

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг.1, как это более подробно описано ниже, проиллюстрирована противоопухолевая активность Соединений 1 и 2 и устойчивость к Соединениям 1 и 2 на модели с использованием аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-p53-/- после обработки в течение 25 дней;

на фиг.2, как это более подробно описано ниже, проиллюстрирована противоопухолевая активность Соединений 1 и 2 и устойчивость к Соединениям 1 и 2 на модели с использованием аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-Nrc+/- после непрерывных обработок;

на фиг.3, как это более подробно описано ниже, проиллюстрирована противоопухолевая активность Соединений 1 и 2 и устойчивость к Соединениям 1 и 2 на модели с использованием аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/- после непрерывных обработок;

на фиг.4, как это более подробно описано ниже, представлены данные об

амплификации GH2, выявленные в 2 из 3 устойчивых опухолях;

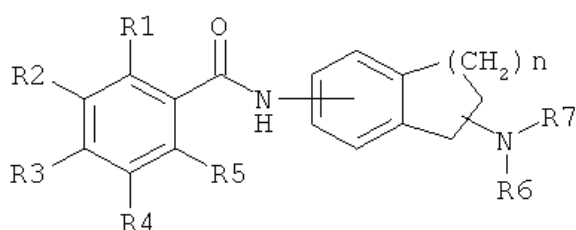
на фиг.5 - результаты анализа *ex vivo*, полученные для медуллобластомы методом вестерн-блоттинга, которые более подробно описаны ниже. Как показали результаты вестерн-блоттинга, соединение, являющееся ингибитором PI3K, а именно Соединение А, обладало способностью ингибировать фосфорилирование Akt и S6 как в чувствительных, так и в устойчивых клетках;

на фиг.6А и 6Б - результаты воздействия комбинации Соединения А и Соединения 1, полученные на модели с использованием аллотрансплантата линии Ptc+/-Nrc+/-, которые демонстрируют, что комбинация обладает способностью предупреждать или замедлять развитие устойчивости при использовании рассматриваемой модели медуллобластомы;

на фиг.7А и 7Б - результаты воздействия комбинации Соединения Б и Соединения 1, полученные на модели с использованием аллотрансплантата линии Ptc+/-Nrc+/-, которые демонстрируют, что комбинация обладает способностью предупреждать или замедлять развитие устойчивости при использовании рассматриваемой модели медуллобластомы.

Подробное описание изобретения

Ингибиторами Smoothened могут являться соединения, например, биарилкарбоксамидные производные формулы (I):



(I)

в которой

R2-C, R3-C, R4-C или R5-C могут быть замещены N;

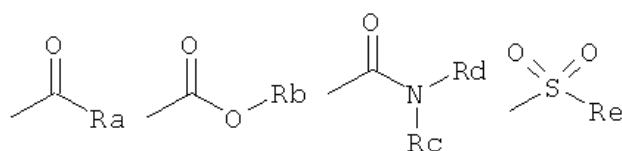
n обозначает 1, 2 или 3;

R1 обозначает карбоциклический арил или гетероарил;

R2, R3, R4 и R5 независимо друг от друга обозначают водород, (низш.) алкил, (низш.) алкоксигруппу, (низш.) алкилтиогруппу, фтор, хлор, бром, аминогруппу, замещенную аминогруппу, трифторметил, ацилоксигруппу, алкилкарбонил, трифторметоксигруппу или цианогруппу;

R6 обозначает водород, необязательно замещенный алкил, карбоциклический или гетероциклический арил-(низш.) алкил;

R7 обозначает водород, необязательно замещенный алкил, карбоциклический арил, гетероарил, карбоциклический арил-(низш.) алкил, гетероарил-(низш.) алкил или



в которых

Ra обозначает необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил или гетероциклический;

Rb обозначает необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил или гетероциклический;

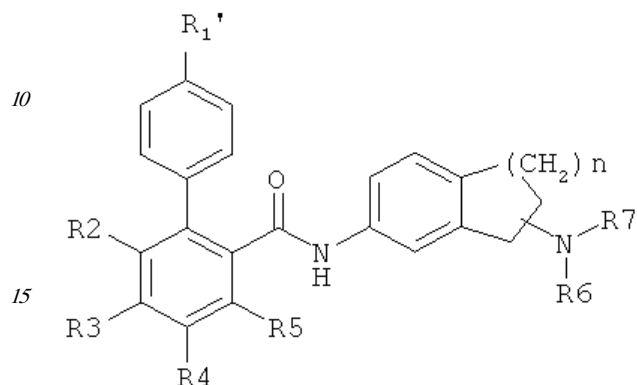
Rc и Rd независимо друг от друга обозначают водород, замещенный алкил, циклоалкил, арил; или

гетероциклил, или R_c и R_d вместе обозначают (низш.)алкилен или (низш.)алкилен, замещенный O, S, N-(H, алкил, арилалкил);

R_e обозначает необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил или гетероциклил, аминогруппу или замещенную аминогруппу;

и их фармацевтически приемлемые соли и их энантиомеры.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Ia)



(Ia)

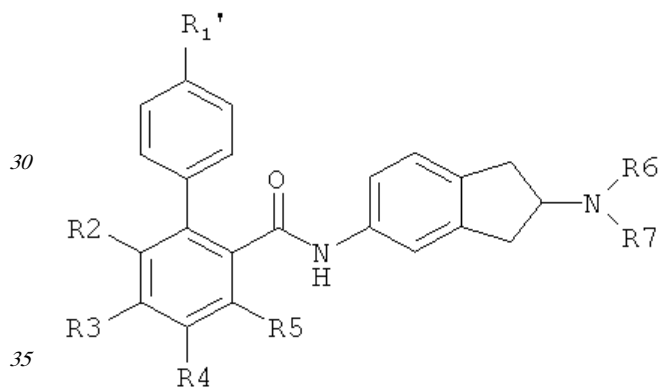
в которой R₂-C, R₃-C, R₄-C или R₅-C могут быть замещены N;

где R₁' обозначает водород, фтор, хлор, бром, (низш.)алкил, цианогруппу, метоксигруппу, трифторметил, трифторметоксигруппу, диметиламиногруппу;

R₂-R₇ имеют значения, указанные для формулы I,

и их фармацевтически приемлемым солям и их энантиомерам.

Другой предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Ib)



(Ib)

в которой

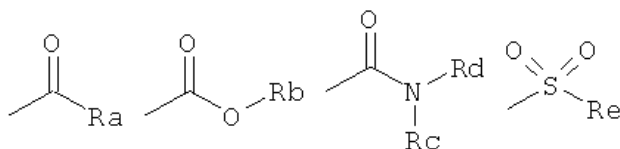
R₁' обозначает трифторметил, хлор, фтор;

R₂ и R₃ независимо друг от друга обозначают водород, C₁-C₄алкил, C₁-C₄алкоксигруппу, трифторметил, хлор или фтор;

R₄ и R₅ обозначают водород;

R₆ обозначает водород или C₁-C₃алкил;

R₇ обозначает необязательно замещенный алкил, карбоциклический арил, гетероарил, карбоциклический арил-(низш.)алкил, гетероарил-(низш.)алкил, или



5 в которых
 Ra обозначает необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил или гетероциклил;
 Rb обозначает необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил или гетероциклил;
 Rc и Rd независимо друг от друга обозначают водород, замещенный алкил,
 циклоалкил, арил; или
 10 гетероциклил, или Rc и Rd вместе обозначают (низш.)алкилен или (низш.)алкилен,
 замещенный O, S, N-(H, алкил, арилалкил);
 Re обозначает необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил или гетероциклил,
 аминогруппу или замещенную аминогруппу;
 и их фармацевтически приемлемым солям и их энантиомерам.

15 Другой предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Ib),

в которой

R1' обозначает трифторметил, хлор, фтор;

R2 и R3 независимо друг от друга обозначают водород, C₁-C₄алкил,

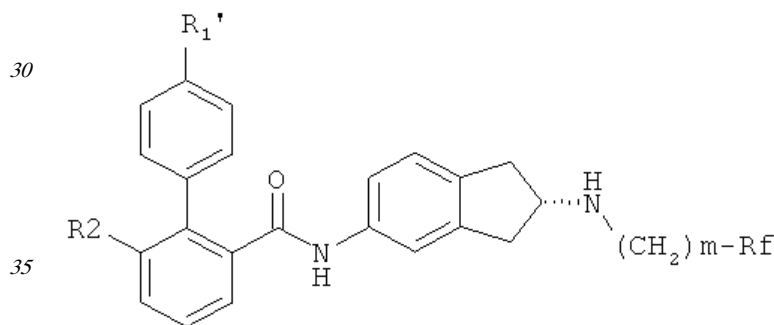
20 C₁-C₄алкоксигруппу, трифторметил, хлор или фтор;

R4 и R5 обозначают водород;

R6 обозначает водород;

R7 обозначает необязательно замещенный алкил, карбоциклический арил, гетероарил,
 25 карбоциклический арил-(низш.)алкил или гетероарил-(низш.)алкил;
 и их фармацевтически приемлемым солям и их энантиомерам.

Другой наиболее предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к соединениям формулы (Ic)



(Ic)

40 в которой R1' обозначает трифторметил или хлор;

R2 обозначает водород или метил;

m обозначает 0 или 1;

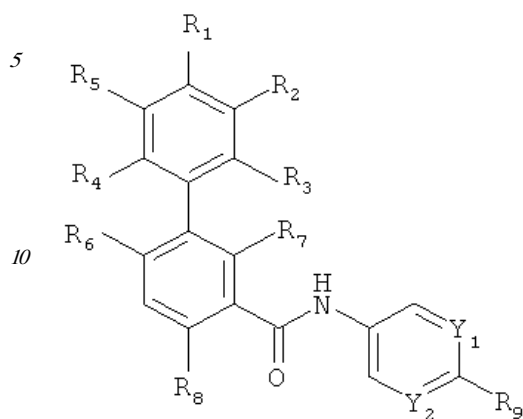
Rf обозначает карбоциклический или гетероциклический арил;

и их фармацевтически приемлемым солям.

45 Соединения, входящие в комбинации, предлагаемые в изобретении, в зависимости от природы их заместителей, указанных в настоящем описании, несут один или несколько асимметричных атомов углерода и, следовательно, существуют в виде их рацематов и R- и S-энантиомеров. Предпочтительным является обладающий наибольшей

активностью энантиомер, который, как правило, соответствует S-конфигурации (на атоме углерода, имеющем заместитель NR₆R₇).

К ингибиторам Smoothened могут относиться также соединения формулы II:



Формула II,

в которой

Y₁ и Y₂ независимо друг от друга выбраны из N и CR₁₀; где R₁₀ выбран из группы, включающей водород, галоген, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу, замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу и -OXNR_{10a}R_{10b}; где R_{10a} и R_{10b} независимо друг от друга выбраны из водорода и C₁-C₆алкила;

R₁ выбран из группы, включающей цианогруппу, галоген, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу, замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу, C₆-C₁₀арил, диметиламиногруппу, C₁-C₆алкилсульфанил и C₃-C₈гетероциклоалкил, который необязательно имеет вплоть до заместителей, представляющих собой C₁-C₆алкильные радикалы;

R₂ и R₅ независимо друг от друга выбраны из группы, включающей водород, цианогруппу, галоген, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу, замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу и диметиламиногруппу;

R₃ и R₄ независимо друг от друга выбраны из группы, включающей водород, галоген, цианогруппу, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу и замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу; или либо один из R₁ и R₂, либо R₁ и R₅ вместе с фенилом, к которому они оба присоединены, образуют C₅-C₁₀гетероарил;

R₆ и R₇ независимо друг от друга выбраны из группы, включающей водород, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу и замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу; при условии, что R₆, и R₇ оба не обозначают водород;

R₈ выбран из группы, включающей водород, галоген, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу и замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу;

R₉ выбран из группы, включающей -S(O)₂R₁₁, -C(O)R₁₁, -OR₁₁, -NR_{12a}R_{12b} и -R₁₁, где R₁₁ выбран из группы, включающей арил, гетероарил, циклоалкил и гетероциклоалкил;

R_{12a} и R_{12b} независимо друг от друга выбраны из C₁-C₆алкила и замещенного гидроксигруппой C₁-C₆алкила;

где арил, гетероарил, циклоалкил и гетероциклоалкил, входящие в R₉, необязательно могут быть замещены 1-3 радикалами, независимо друг от друга выбранными из группы, включающей C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆ алкил, C₁-C₆алкоксигруппу, замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу, C₆-C₁₀арил-C₀-C₄алкил, C₅-C₁₀гетероарил-C₀-C₄алкил, C₃-C₁₂циклоалкил и C₃-C₈гетероциклоалкил;

где арилалкильный заместитель, входящий в R₉, необязательно замещен 1-3 радикалами, независимо друг от друга выбранными из группы, включающей галоген, C₁-C₆алкил, замещенный галогеном C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкоксигруппу, замещенную галогеном C₁-C₆алкоксигруппу и метилпиперазинил;

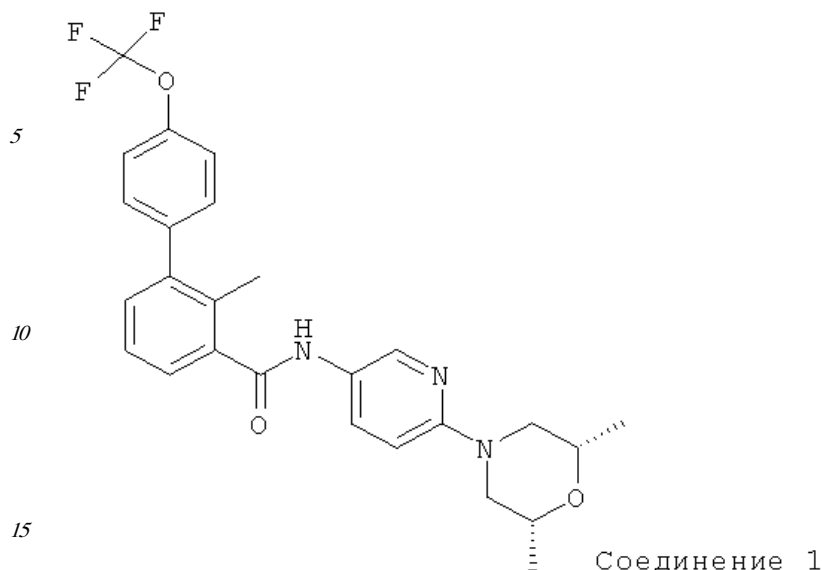
и их N-оксидные производные, производные, представляющие собой пролекарства, защищенные производные, их индивидуальные изомеры и смеси изомеров; и фармацевтически приемлемые соли и сольваты (например, гидраты) таких соединений.

Предпочтительные соединения формулы II выбирают из группы, включающей [4-(морфолин-4-сульфонил)фенил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2,6-диметилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-циан-2-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-метокси-2-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-циклогексилфенил)амид 4'-метокси-2-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2-метилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-метокси-2-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-циклогексилфенил)амид 4'-диметиламино-2-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-диметиламино-2-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-[1,4]оксазепан-4-илпиридин-3-ил)амид 6-хлор-4'-диметиламинобифенил-3-карбоновой кислоты, (6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)амид 6-хлор-4'-диметиламинобифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-хлор-4'-диметиламинобифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2-метилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид 6-хлор-4'-метоксибифенил-3-карбоновой кислоты, (6-[1,4]оксазепан-4-илпиридин-3-ил)амид 6-хлор-4'-метоксибифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-хлор-4'-метоксибифенил-3-карбоновой кислоты, (6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)амид 6-хлор-4'-метоксибифенил-3-карбоновой кислоты, (6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)амид 4'-метокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-[1,4]оксазепан-4-илпиридин-3-ил)амид 4'-метокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2-метилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-метокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2-метилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-диметиламино-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-[1,4]оксазепан-4-илпиридин-3-ил)амид 4'-диметиламино-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)амид 4'-диметиламино-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-метокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-этокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-4'-метилсульфанилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-диметиламино-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-[1,1';4',1'']терфенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 3'-хлор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 2',4'-дихлор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 2'-хлор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-

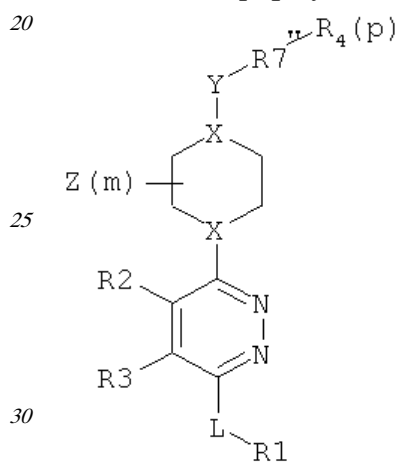
азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 3'-хлор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 3',4'-дихлор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 3'-хлор-6-метил-4'-трифторметилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6,4'-диметилбифенил-3-карбоновой кислоты, 5 (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-этил-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-трет-бутил-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-4'-пропилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-изобутил-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-изопропил-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, 10 (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6,2',6'-триметилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6,2',3'-триметилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-4'-трифторметилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-3'-трифторметилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-3', 5'-бистрифторметилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 3'-изопропокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, 3'-этоксид-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 2',6'-диметоксид-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-4'-трифторметоксибифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 6-метил-3'-трифторметоксибифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-метокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 3'-метокси-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-(2-диметиламиноэтоксид)-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 3'-диметиламино-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-фтор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 3'-фтор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 2'-фтор-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, 4-метил-N-(4-морфолин-4-илфенил)-3-хиноксалин-6-илбензамид, (4-морфолин-4-илфенил)амид 6-метил-4'-(4-метилпиперазин-1-ил)бифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 2'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 3'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-[1,4]оксазепан-4-илпиридин-3-ил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-азепан-1-илпиридин-3-ил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2-метилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (3,4,5,6-тетрагидро-2H-[1,2']бипиридинил-5'-ил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (6-морфолин-4-илпиридин-3-ил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(4-метилпиперазин-1-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (3-фтор-4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (3-хлор-4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (3-бром-4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (3-метил-4-морфолин-4-илфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-морфолин-4-ил-3-трифторметилфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4-циклогексилфенил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, бифенил-4-иламид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (4'-метоксибифенил-4-ил)амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [4-(4-бензилпиперазин-1-ил)фенил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [4-(пиперидин-1-сульфонил)фенил]

цианбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(2,6-диметилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид
 4'-циан-6-этилбифенил-3-карбоновой кислоты, {6-[4-(3-фторбензил)пиперазин-1-ил]
 пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, {6-[4-(2-
 трифторметоксибензил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-
 5 карбоновой кислоты, {6-[4-(3-хлорбензил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил} амид 4'-циан-
 6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, {6-[4-(4-изобутилбензил)пиперазин-1-ил]
 пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, {6-[4-(4-трет-
 бутилбензил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой
 10 кислоты, {6-[4-(7-метоксибензо[1,3]диоксол-5-илметил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил}
 амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(4-бензилпиперазин-1-ил)
 пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(4-пиридин-3-
 илметилпиперазин-1-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой
 15 кислоты, {6-[4-(4-дифторметоксибензил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-
 метилбифенил-3-карбоновой кислоты, {6-[4-(4-цианбензил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-
 ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(4-хинолин-5-
 илметилпиперазин-1-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой
 20 кислоты, [6-(4-пиридин-4-илметилпиперазин-1-ил)пиридин-3-ил]амид 4'-циан-6-
 метилбифенил-3-карбоновой кислоты, [6-(4-пиридин-2-илметилпиперазин-1-ил)пиридин-
 3-ил]амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, {6-[4-(4-имидазол-1-илбензил)
 25 пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты,
 {6-[4-(3-цианбензил)пиперазин-1-ил]пиридин-3-ил} амид 4'-циан-6-метилбифенил-3-
 карбоновой кислоты, [6-(4-изохинолин-5-илметилпиперазин-1-ил)пиридин-3-ил]амид
 4'-циан-6-метилбифенил-3-карбоновой кислоты, (R)-2-метил-N-(6-(2-метилморфолино)
 пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, 4'-циан-2-метил-N-(6-
 30 сульфонилморфолинопиридин-3-ил)бифенил-3-карбоксамид, (S)-4'-циан-2-метил-N-(6-
 (2-метилморфолино)пиридин-3-ил)бифенил-3-карбоксамид, (R)-6-хлор-N-(6-(2-
 метилморфолино)пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, 4'-циан-
 2-метил-N-(6-сульфинилморфолинопиридин-3-ил)бифенил-3-карбоксамид, 4'-циан-N-
 (6-(диизобутиламино)пиридин-3-ил)-2-метилбифенил-3-карбоксамид, 4'-циан-N-(2-(
 35 (2S,6R)-2,6-диметилморфолино)пиримидин-5-ил)-2-метил-4'-(трифторметил)бифенил-
 3-карбоксамид, N-(2-((2S,6R)-2,6-диметилморфолино)пиримидин-5-ил)-2-метил-4'-
 (трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, N-(2-(бис(2-гидроксиэтил)амино)пиримидин-
 5-ил)-2-метил-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, 2-метил-N-(6-(тетрагидро-
 40 2H-пиран-4-илокси)пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, N-(5-
 хлор-6-((2S,6R)-2,6-диметилморфолино)пиридин-3-ил)-2-метил-4'-(трифторметокси)
 бифенил-3-карбоксамид, N-(6-((2R,6S)-2,6-диметилтетрагидро-2H-пиран-4-ил)пиридин-
 3-ил)-2-метил-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, N-(6-(4-этилпиперазин-1-
 карбонил)пиридин-3-ил)-2-метил-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, 2-метил-
 45 N-(6-(2-оксопиперазин-1-ил)пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид,
 2-метил-N-(6-(1-(пиридин-4-илметил)пиперидин-4-ил)пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)
 бифенил-3-карбоксамид, 2-метил-N-(6-(2-оксо-4-(пиридин-4-илметил)пиперазин-1-ил)
 пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид, 2-метил-N-(6-(1-(пиридин-
 4-илметил)пиперидин-3-ил)пиридин-3-ил)-4'-(трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид,
 N-(6-(1-этилпиперидин-3-ил)пиридин-3-ил)-2-метил-4'-(трифторметокси)бифенил-3-
 карбоксамид и N-(6-((2R,6S)-2,6-диметилморфолино)пиридин-3-ил)-2-метил-4'-
 (трифторметокси)бифенил-3-карбоксамид и [6-(цис-2,6-диметилморфолин-4-ил)пиридин-
 3-ил]амид 2-метил-4'-трифторметоксибифенил-3-карбоновой кислоты (также

обозначенный в настоящем описании как Соединение 1), имеющий формулу:



Указанное выше соединение формулы II описано также в WO 2007/131201. К соединениям, являющимся ингибиторами Smoothened, могут относиться также соединения формулы III:



формула III

в которой

R1 обозначает C₁-C₆арильную группу или 5-14-членную гетероарильную группу, которая может быть незамещенной или может быть замещена;

R2 и R3 независимо друг от друга обозначают C₁-C₈алкил, C₁-C₈алкил-ОН или R2 и R3 образуют слитую C₃-C₁₄циклоалкильную группу;

L обозначает связь, C₁-C₈алкилен, -C(O)O-, -C(O)NR₉-, -C₁-C₈алкил-ОН-, -C₁-C₈галоалкил-, -C(O)-, -NH- или -O-;

X и W независимо друг от друга обозначают N или CR₅, и по меньшей мере один из X или W обозначает N;

R7 обозначает C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу или 3-14-членную циклогетероалкильную группу;

R4 обозначает C₁-C₈алкильную, C₂-C₈алкенильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу, 3-14-членную циклогетероалкильную группу, C₁-C₈алкоксигруппу, галоген, NR₆R₈, C(O)OR₆, C(O)

NR6R8, C₁-C₈галоалкил, формил, карбалкоксигруппу, C₁-C₈алкил-ОН, C(O)R6, SO₂R₆, C(O)NH-C₁-C₈алкил-R6, NR6R8, SO₂NR6R8, OCF₃, NHC(O)R6, CH₂OC(O)NR6R8, CH₂NR6R8, NHC(O)OR6, NHC(O)NR6R8, CH₂NHSO₂R6, CH₂NHC(O)OR6, OC(O)R6 или NHC(O)R6, который может быть замещенным или незамещенным;

Z обозначает C₁-C₈алкил, CN, OH или галоген;

m и p независимо друг от друга обозначают 0-3;

Y обозначает связь, C₁-C₈алкилен, -C(O)-, -C(O)O-, -CH(OH)- или -C(O)NR10;

R5 обозначает H, галоген, CN, (низш.)алкил, OH, OCH₃ или OCF₃;

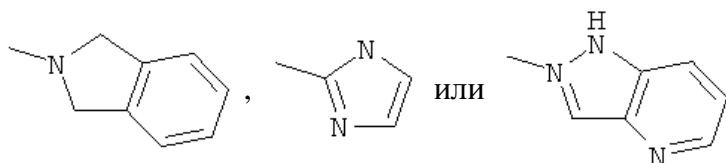
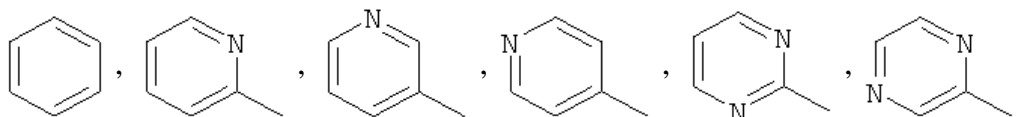
где R1 может иметь один или несколько заместителей, выбранных из группы, включающей C₁-C₈алкильную, C₆-C₁₄арильную группу, C₁-C₈галоалкильную, C₁-C₈алкоксигруппу, галоген, NH₂, CN, OCF₃, OH, C(O)NR6R8, C(O)R6, NR6R8, NHC(O)R6, SO₂R₆, SO₂NR6R8;

R9 и R10 независимо друг от друга обозначают C₁-C₈алкил или H;

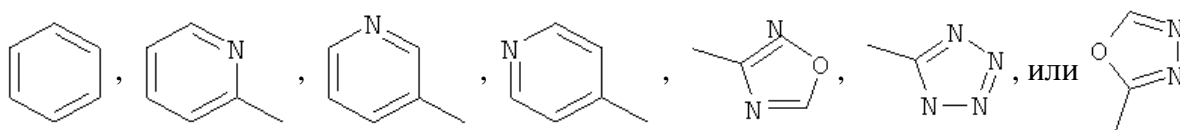
R6 и R8 независимо друг от друга обозначают H, C₁-C₈алкильную, C₂-C₈алкенильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу, 3-14-членную циклогетероалкильную группу, C₁-C₈галоалкильную, C₁-C₈алкил-ОН, C₁-C₈алкоксигруппу или два R6 на одном атоме могут формировать содержащее гетероатом кольцо; и

где R4, R6 и R8 могут быть незамещенными или могут иметь один или несколько заместителей, выбранных из группы, включающей C₁-C₈алкильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу, 3-14-членную циклогетероалкильную группу, C₁-C₈алкилОН, OH, оксогруппу, C₁-C₈галоалкил, карбокси-C₁-C₈алкил или SO₂-C₁-C₈алкил, галоген, -OCH₃, -OCF₃, -OH, -NH₂.

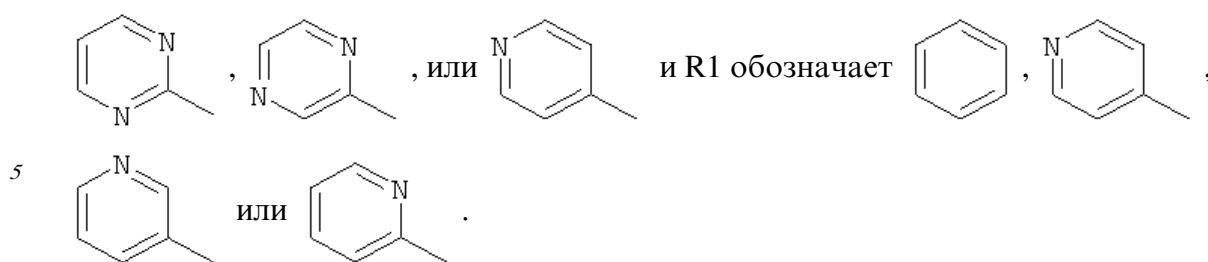
Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой R7 обозначает



Следующий вариант осуществления изобретения относится к соединениям формулы III по п.1, в которой R1 обозначает



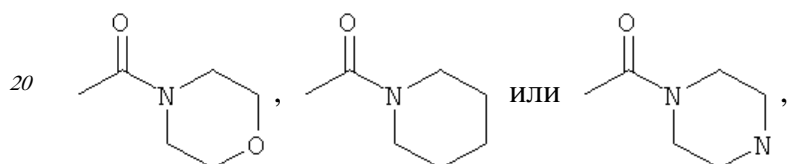
Еще один вариант осуществления изобретения относится к соединениям формулы III, в которой R7 обозначает



Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой R4 обозначает C(O)O-C₁-C₈алкил, CF₃, C(O)OR₆, C(O)NR₆R₈, C₁-C₈галоалкил, C₁-C₈алкил-OH, C(O)R₆, SO₂R₆, C(O)NH-C₁-C₈алкил-R₆, C(CH₃)(CH₃)(OH), C(O)CH₃, C(CH₂)CH₃ или C(CH₃)(CH₂OH)OH; и

R₆ и R₈ независимо друг от друга обозначают H, C₁-C₈алкильную, C₁-C₈алкенильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу или 3-14-членную циклогетероалкильную группу.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой R4 обозначает



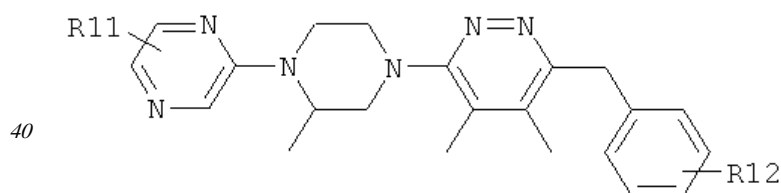
который может быть незамещенным или замещенным.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой R₂ и R₃ обозначают C₁-C₈алкил.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой R₂ и R₃ обозначают CH₃.

Следующий вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой L обозначает -O-, -NH-, -C(O)-, -CH(OH)-, -CH₂-, -CF₂-, -CHF-, -CONH- или связь. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой L обозначает -CH₂-. Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы III, в которой оба X обозначают N и Z обозначает CH₃.

Следующий вариант осуществления настоящего изобретения относится к соединениям формулы (IIIa):



(IIIa)

и их фармацевтически приемлемым солям, где

R₁₁ обозначает C₁-C₈алкильную, C₂-C₈алкенильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу, 3-14-членную циклогетероалкильную группу, C₁-C₈алкоксигруппу, галоген, NR₁₃R₁₄, C(O)OR₁₃, C

(O)NR13R14, C₁-C₈галоалкил, формил, карбалкоксигруппу, C₁-C₈алкил-ОН, C(O)R13, SO₂R13, C(O)NH-C₁-C₈алкил-R13, NR13R14, SO₂NR13R14, OCF₃, NHC(O)R13, CH₂OC(O)NR13R14, CH₂NR13R14, NHC(O)OR13, NHC(O)NR13R14, CH₂NHSO₂R13, CH₂NHC(O)OR13, OC(O)R13 или NHC(O)R13, который может быть замещенным или незамещенным; R12 обозначает C₁-C₈алкильную, C₆-C₁₄арильную группу, C₁-C₈галоалкил, C₁-C₈алкоксигруппу, галоген, NH₂, CN, OCF₃, OH, C(O)NR13R14, C(O)R13, NR13R14, NHC(O)R13, SO₂R13, SO₂NR13R14;

R13 и R14 независимо друг от друга обозначают H, C₁-C₈алкильную, C₂-C₈алкенильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу, 3-14-членную циклогетероалкильную группу, C₁-C₈галоалкил, C₁-C₈алкил-ОН, C₁-C₈алкоксигруппу или R13 и R14 на одном атоме могут формировать содержащее гетероатом кольцо; и

где R11, R13 и R14 могут быть незамещенными или иметь один или несколько заместителей, выбранных из группы, включающей C₁-C₈алкильную, C₃-C₁₄циклоалкильную, C₆-C₁₄арильную группу, 5-14-членную гетероарильную группу, 3-14-членную циклогетероалкильную группу, C₁-C₈алкилОН, OH, оксогруппу, C₁-C₈галоалкил, карбокси-C₁-C₈алкил или SO₂-C₁-C₈алкил, галоген, -OCH₃, -OCF₃, -OH, -NH₂.

Ингибиторы Smoothened могут представлять собой соединения, описанные в публикации РСТ WO 2003/011219 (например, соединение, представляющее собой N-[4-хлор-3-(5-диметиламино-1H-бензимидазол-2-ил)фенил]-3,5-диметоксибензамид (которое в настоящем описании обозначено как Соединение 2)), содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Ингибиторы Smoothened могут представлять собой также соединения, описанные в публикации РСТ WO 2003/011219, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Ингибиторы Smoothened могут представлять собой также соединения, описанные в публикациях РСТ WO 2006/028958 (например, соединение, представляющее собой 2-хлор-N-(4-хлор-3-(пиридин-2-ил)фенил)-4-(метилсульфонил)бензамид), WO 2008/14291, WO 07120827 и WO 0650351, содержание всех указанных документов включено в настоящее описание в качестве ссылки.

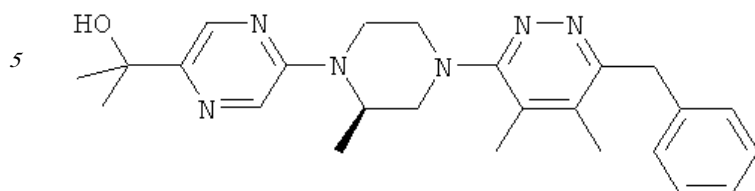
Способы, предлагаемые в настоящем изобретении, предусматривают применение фармацевтических композиций, которые содержат ингибиторы Smoothened, например, соединения формулы I, формулы II или формулы III, или любое из соединений, перечисленных в настоящем описании или включенных в него в качестве ссылки, или его N-оксидное производное, его индивидуальные изомеры и смеси изомеров; или их фармацевтически приемлемые соли, в смеси с одним или несколькими пригодными эксципиентами.

Ингибиторы Smoothened, которые применяют в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, можно получать согласно методам, описанным в патентных публикациях РСТ WO 01/05767 и WO 00/05201 и у Ksander и др., Journal of Medicinal Chemistry, 44, 2001, с.4677, содержание всех указанных документов включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Соединения формул II и IIa описаны также в заявке на патент США №12/503565, которая является копией международной заявки на патент РСТ/EP09/059138.

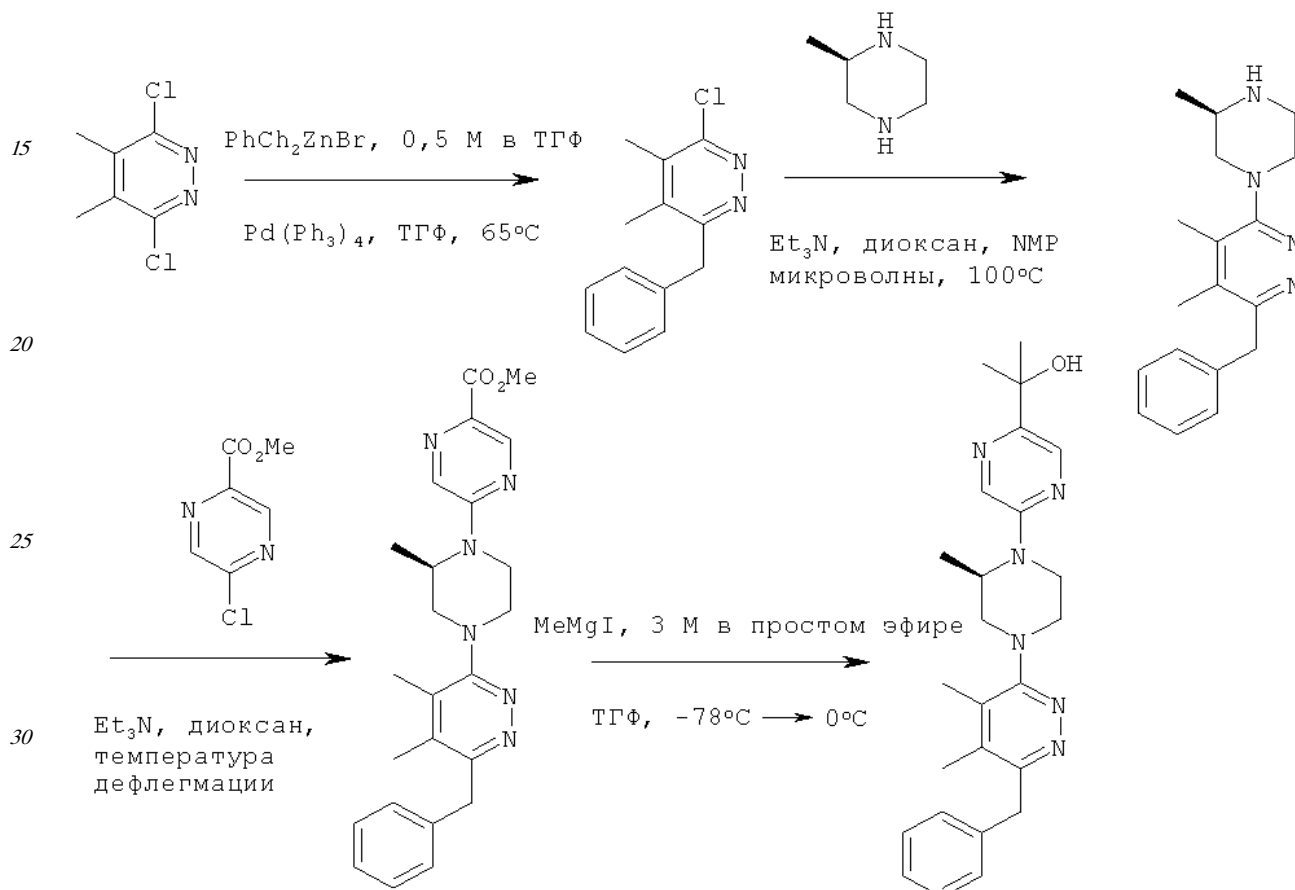
Предпочтительным соединением формулы (II) является 2-[(R)-4-(6-бензил-4,5-

диметилпиридазин-3-ил)-2-метил-3,4,5,6-тетрагидро-2H-[1,2']бипиразинил-5'-ил]пропан-2-ол (в настоящем описании это соединение обозначено также как Соединение 3), имеющее следующую формулу:



Соединение 3

10 2-[(R)-4-(6-Бензил-4,5-диметилпиридазин-3-ил)-2-метил-3,4,5,6-тетрагидро-2H-[1,2']бипиразинил-5'-ил]пропан-2-ол можно получать согласно схеме 1:



35 Первая стадия: Смесь, содержащую 4,5-диметил-1,4-дихлорпиридазин (10 г, 56,5 ммоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0) (3,3 г, 2,80 ммоль) и ТГФ (200 мл), дегазировали и затем добавляли бензилцинк бромид (147 мл, 0,5М в ТГФ, 73,40 ммоль). Реакционный раствор выдерживали при 65°C в течение ночи. Растворитель удаляли. Добавляли воду и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой концентрировали, получая неочищенный продукт, который очищали с помощью хроматографии на силикагеле (EtOAc/гептан: 0%~50%), в результате чего получали 3-бензил-6-хлор-4,5-диметилпиридазин (9,5 г, 67%).

40 Вторая стадия: 3-Хлор-4,5-диметил-6-((R)-3-метилпиперазин-1-ил)пиридазин (400 мг, 1,66 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору, содержащему бензилцинк бромид (12,3 мл, 0,5М в ТГФ, 6,64 ммоль, 4 экв.) и тетраakis(трифенилфосфин)палладий (100 мг, 0,08 ммоль, 0,05 экв.), в пробирке для микроволновой печи. Пробирку закрывали и облучали в микроволновой печи при 100°C (режим высокой абсорбции) в течение 40 мин. Реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью хроматографии на

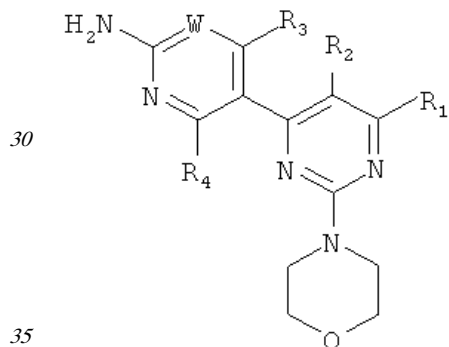
силикагеле (5 -20% EtOAc/гептан), в результате чего получали 3-бензил-4,5-диметил-6-((R)-3-метилпиперазин-1-ил)пиридазин (324 мг, 66%).

Третья стадия: Смесь, содержащую указанное выше соединение (6,0 г, 20,27 ммоль), метиловый эфир 5-хлорпиразин-2-карбоновой кислоты (5,3 г, 30,30 ммоль), Et₃N (6,2 г, 60,60 ммоль) и диоксан (100 мл), выдерживали при температуре дефлегмации в течение ночи. Растворитель удаляли. Добавляли насыщенный раствор NH₄Cl и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой концентрировали, получая неочищенный продукт, который очищали с помощью хроматографии на силикагеле (EtOAc/гептан: 50%~100%), в результате чего получали метиловый эфир (R)-4-(6-бензил-4,5-диметилпиридазин-3-ил)-2-метил-3,4,5,6-тетрагидро-2H-[1,2']бипиразинил-5'-карбоновой кислоты (6,6 г, 76%) в виде твердого вещества желтого цвета.

Конечная стадия: К раствору метилового эфира (R)-4-(6-бензил-4,5-диметилпиридазин-3-ил)-2-метил-3,4,5,6-тетрагидро-2H-[1,2']бипиразинил-5'-карбоновой кислоты (840 мг, 1,85 ммоль) в ТГФ (12 мл) добавляли при -78°C метилмагнийбромид (5 мл, 15 ммоль, 3 М в простом эфире). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем разбавляли с помощью ДХМ и промывали NH₄Cl и водой.

Объединенные органические слои промывали водой, соляным раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. После очистки неочищенного продукта с помощью ЖХВР с использованием ацетонитрила в воде (от 10% до 95% с добавлением 3% 1-пропанола) с обнаружением при длине волны 220 нм получали требуемое соединение 3 (400 мг, 50%) наряду с небольшими количествами соответствующего метилкетона. Растворители удаляли с помощью лиофилизатора, в результате чего получали продукты в виде порошков белого цвета.

Соединения, являющиеся ингибиторами фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), как это более подробно описано ниже, могут представлять собой соединения формулы А



(формула А),

или их стереоизомеры, таутомеры или фармацевтически приемлемые соли, где в указанной формуле W обозначает CR_w или N, где R_w выбран из группы, включающей

- 40
- (1) водород,
 - (2) цианогруппу,
 - (3) галоген,
 - (4) метил,
 - (5) трифторметил,
 - 45 (6) сульфонамидогруппу;

R₁ выбран из группы, включающей

- (1) водород,
- (2) цианогруппу,

- (3) нитрогруппу,
 (4) галоген,
 (5) замещенный и незамещенный алкил,
 (6) замещенный и незамещенный алкенил,
 5 (7) замещенный и незамещенный алкинил,
 (8) замещенный и незамещенный арил,
 (9) замещенный и незамещенный гетероарил,
 (10) замещенный и незамещенный гетероциклил,
 (11) замещенный и незамещенный циклоалкил,
 10 (12) -COR1a,
 (13) -CO₂R1a,
 (14) -CONR1aR1b,
 (15) -NR1aR1b,
 (16) -NR1aCOR1b,
 15 (17) -NR1aSO₂R1b,
 (18) -OCOR1a,
 (19) -OR1a,
 (20) -SR1a,
 (21) -SOR1a,
 20 (22) -SO₂R1a и
 (23) -SO₂NR1aR1b,

где R1a и R1b независимо друг от друга выбраны из группы, включающей

- (а) водород,
 25 (б) замещенный и незамещенный алкил,
 (в) замещенный и незамещенный арил,
 (г) замещенный и незамещенный гетероарил,
 (д) замещенный и незамещенный гетероциклил и
 (е) замещенный и незамещенный циклоалкил;

30 R2 выбран из группы, включающей

- (1) водород,
 (2) цианогруппу,
 (3) нитрогруппу,
 (4) галоген,
 35 (5) гидроксигруппу,
 (6) аминогруппу,
 (7) замещенный и незамещенный алкил,
 (8) -COR2a и
 (9) -NR2aCOR2b,

40 где R2a и R2b независимо друг от друга выбраны из группы, включающей

- (а) водород и
 (б) замещенный и незамещенный алкил;
 R3 выбран из группы, включающей
 (1) водород,
 45 (2) цианогруппу,
 (3) нитрогруппу,
 (4) галоген,
 (5) замещенный и незамещенный алкил,

- (6) замещенный и незамещенный алкенил,
 (7) замещенный и незамещенный алкинил,
 (8) замещенный и незамещенный арил,
 (9) замещенный и незамещенный гетероарил,
 5 (10) замещенный и незамещенный гетероциклил,
 (11) замещенный и незамещенный циклоалкил,
 (12) -COR3a,
 (13) -NR3aR3b,
 (14) -NR3aCOR3b,
 10 (15) -NR3aS02R3b,
 (16) -OR3a,
 (17) -SR3a,
 (18) -SOR3a,
 (19) -SO₂R3a и
 15 (20) -SO₂NR3aR3b,

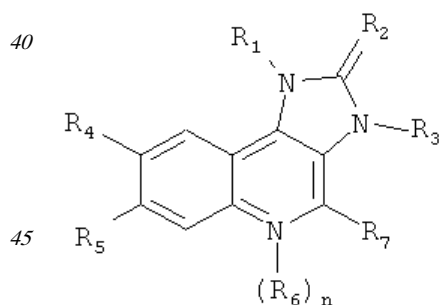
где R3a и R3b независимо друг от друга выбраны из группы, включающей

- (а) водород,
 (б) замещенный и незамещенный алкил,
 (в) замещенный и незамещенный арил,
 20 (г) замещенный и незамещенный гетероарил,
 (д) замещенный и незамещенный гетероциклил и
 (е) замещенный и незамещенный циклоалкил;
 и R4 выбран из группы, включающей
 (1) водород и
 25 (2) галоген.

Радикалы и символы, используемые в определении соединения формулы I, имеют значения, указанные в публикации PCT WO 07/084786, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. В WO 07/084786 описаны пиримидиновые производные, которые, как было установлено, обладают способностью модулировать активность
 30 липидкиназ, таких как киназы PI3. Конкретные пиримидиновые производные, которые можно применять согласно настоящему изобретению, их получение и содержащие их пригодные фармацевтические композиции описаны в WO 07/084786.

Предпочтительным для применения согласно настоящему изобретению соединением является 5-(2,6-диморфолин-4-илпиримидин-4-ил)-4-трифторметилпиридин-2-иламин
 35 (в настоящем описании обозначен как Соединение А), синтез которого описан в WO 07/084786 в примере 10.

Соединения, являющиеся ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), как это более подробно описано ниже, могут представлять собой соединения формулы В



(формула В),

в которой

R₁ обозначает нафтил или фенил, где фенил имеет один или два заместителя, независимо друг от друга выбранные из группы, включающей галоген;

(низш.)алкил, незамещенный или замещенный галогеном, цианогруппой, имидазолилом или триазолилом;

циклоалкил;

аминогруппу, замещенную одним или двумя заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, включающей (низш.)алкил, (низш.)алкилсульфонил, (низш.)алкоксигруппу и (низш.)алкокси-(низш.)алкиламиногруппу;

пиперазинил, незамещенный или замещенный одним или двумя заместителями, независимо друг от друга выбранными из группы, включающей (низш.)алкил и (низш.)алкилсульфонил;

2-оксопирролидинил;

(низш.)алкокси-(низш.)алкил;

имидазолил;

пиразолил;и

триазолил;

R₂ обозначает O или S;

R₃ обозначает (низш.)алкил;

R₄ обозначает пиридил, незамещенный или замещенный галогеном, цианогруппой, (низш.)алкилом, (низш.)алкоксигруппой, или пиперазинил, незамещенный или замещенный (низш.)алкилом;

пиримидинил, незамещенный или замещенный (низш.)алкоксигруппой;

хинолинил, незамещенный или замещенный галогеном;

хиноксалинил или

фенил, замещенный алкоксигруппой;

R₅ обозначает водород или галоген;

n обозначает 0 или 1;

R₆ обозначает оксидогруппу,

при условии, что когда n=1, то атом N, несущий радикал R₆, имеет положительный заряд;

R₇ обозначает водород или аминогруппу;

или их таутомеры или фармацевтически приемлемые соли, или гидраты или сольваты.

Указанные в настоящем описании Соединения В и С, представляют собой соединения формулы В.

Способы и комбинации, предлагаемые в настоящем изобретении, предусматривают применение фармацевтических композиций, которые включают ингибиторы Smoothened, например, соединения формулы I, формулы II или формулы III, или любые из соединений, перечисленных в настоящем описании, или включенных в настоящее описание в качестве ссылки, или их N-оксидные производные, индивидуальные изомеры и смесь изомеров; или их фармацевтически приемлемые соли, в смеси с одним или несколькими пригодными эксципиентами.

В качестве ингибиторов РІЗК можно применять соединения, описанные в публикации РСТ WO 2006/122806 (например, соединение, представляющее собой 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хиолин-3-ил-2,3-дигидроимидазо[4,5-с]хиолин-1-ил)фенил]пропионитрил (Соединение В), и, например, соединение, представляющее собой 8-(6-

метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметилфенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-2-он) (Соединение С), содержание указанных документов включено в настоящее описание в качестве ссылки. В качестве ингибиторов PI3K можно применять также соединения, описанные в публикации РСТ WO 07084786 (например, 5 соединение, представляющее собой 5-(2,6-диморфолин-4-ил-пиримидин-4-ил)-4-трифторметилпиридин-2-иламин. Соединение А), содержание указанного документа включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В качестве ингибиторов PI3K можно применять также соединения, описанные в публикациях WO 0712775, WO 07129005, WO 07129048, WO 07129052, WO 07129161, WO 10 0713271, WO 07122410, WO 07080382, WO 07087395, US 07238730, US 072387646 и WO 07082956, содержание указанных документов включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В качестве ингибиторов PI3K можно применять также такие ингибиторы, как XL-147 и XL-765 (Exelixis™), а также SF-1126 (Semaphore Pharmaceuticals™), PX-866 (фирма 15 Oncothyreon) и GDC0941 (фирма Roche).

Определения

Если не указано иное, то все технические и научные понятия имеют значения, хорошо известные обычному специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. В приведенных ниже ссылках специалист в данной области найдет общее 20 определение многих понятий, которые использованы в настоящем изобретении: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, под ред. Smith и др., изд-во Oxford University Press (дополненное изд., 2000 г.); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, под ред. Singleton и др., изд-во John Wiley & Sons (3-е переработанное изд., 2002 г.); и A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), под ред. Martin и Hine, изд-во Oxford 25 University Press (4-е изд., 2000 г.). Кроме того, ниже приведены некоторые определения для того, чтобы помочь специалисту в осуществлении изобретения на практике.

В контексте настоящего описания понятие «подавлять и/или осуществлять реверсию», например, связанного с Hedgehog нарушения (например, рака), относится к устранению 30 указанного связанного с Hedgehog нарушения (например, рака) или перевода его в состояние с меньшей степенью серьезности по сравнению с состоянием, которое было до лечения или которое имеет место без осуществления лечения.

В контексте настоящего описания понятие «излечивать» означает приводить к ремиссии связанного с Hedgehog нарушения (например, рака) у пациента или возникающих эпизодов такого нарушения в процессе лечения.

35 Понятие «профилактика» или «предупреждение» означает осуществление противодействия началу или рецидиву связанного с Hedgehog нарушения (например, рака).

Понятие «диагноз» относится к диагностике, прогнозу, мониторингу, характеристике, отбору пациентов, включая участников клинических испытаний, и к идентификации 40 пациентов, имеющих риск возникновения или страдающих конкретным нарушением или клиническим состоянием, или пациентов, которые с наибольшей вероятностью будут реагировать на конкретную терапевтическую обработку, или для оценки или мониторинга ответа пациента на конкретную терапевтическую обработку.

Понятие «индивидуум» или «пациент» относится к млекопитающему, 45 предпочтительно человеку, который нуждается в лечении состояния, нарушения или заболевания.

«Замедление прогрессирования (развития)» в контексте настоящего описания означает, что введение ингибиторов Smoothened (например, соединения формулы I,

формулы II или формулы III, или любого соединения из числа перечисленных в настоящем описании или включенных в настоящее описание в качестве ссылки) пациентам, находящимся на предстадии или ранней фазе связанного с Hedgehog нарушения (например, рака), предупреждает дальнейшее развитие болезни или замедляет развитие болезни по сравнению с развитием заболевания в ситуации, когда не осуществляют введение действующего вещества.

Понятие «комбинации, предлагаемые в изобретении» или аналогичные фразы, относятся к комбинациям, включающим антагонисты или ингибиторы пути передачи сигналов Smo (например, ингибиторов Smoothened) и одну или несколько из следующих субстанций: (I) ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины); и (II) ингибиторы Gli.

В контексте настоящего описания понятие «Hedgehog» применяют в качестве общего названия любого представителя семейства Hedgehog, включая sonic, Indian, desert и tiggy winkle. Понятие можно применять для обозначения белка или гена. Понятие можно использовать также для обозначения последовательностей гомологов/ортологов у различных видов животных.

Понятия «путь передачи (трансдукции) сигналов Hedgehog (Hh)» и «передача сигналов Hedgehog (Hh)» используют взаимозаменяемо, и они относятся к цепи (каскаду) событий, которые в норме опосредуются различными представителями сигнального каскада, такими как Hedgehog, patched (Ptch), Smoothened (Smo) и Gli. Путь Hedgehog может активироваться даже в отсутствии белка Hedgehog в результате активации низлежащего компонента. Например, сверхэкспрессия Smo должна приводить к активации пути в отсутствии Hedgehog.

Компоненты пути передачи сигналов Hh или представители пути передачи сигналов Hh представляют собой продукты гена, участвующие в пути передачи сигналов Hh. Компонент пути передачи сигналов Hh часто оказывает существенное или значительное воздействие на трансмиссию сигналов Hh в клетках/тканях, как правило, приводящее к изменению уровня экспрессии низлежащего гена и/или к фенотипическим изменениям. Компоненты пути передачи сигнала Hh, в зависимости от их биологической функции и воздействий на конечный уровень активации/экспрессии низлежащего гена, можно подразделять на позитивные и негативные регуляторы. Позитивный регулятор представляет собой компонент пути передачи сигнала Hh, который оказывает положительное воздействие на трансмиссию сигнала Hh, т.е. стимулирует низлежащие (последующие) биологические события, когда присутствует Hh. Примерами являются Hedgehog, Smo и Gli. Негативный регулятор представляет собой компонент передачи сигнала Hh, который оказывает отрицательное воздействие на трансмиссию сигнала Hh, т.е. ингибирует низлежащие (последующие) биологические события, когда присутствует Hh. Примерами являются (но не ограничиваясь только ими) Ptch и SuFu.

Понятие «усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog» относится к аномальной модификации или мутации гена или белка Ptc, Hedgehog или Smo, или к уменьшению уровня (или прекращению) экспрессии такого гена, что приводит к фенотипу, сходному с фенотипом, обусловленным контактом клетки с белком Hedgehog, например, к аномальной активации пути Hedgehog. Понятие «усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog» может относиться также к аномальной активации пути Hedgehog, обусловленной повышением уровня экспрессии естественных лигандов в пути Hedgehog, и/или повышением уровня экспрессии Smo. «Усиление функции по доминантно-негативному типу» может включать потерю (утрату) способности продукта гена Ptch осуществлять регуляцию уровня экспрессии генов Gli, например, Gli1, Gli2 и

Gli3. В контексте настоящего описания понятие «усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog» относится также к любому сходному клеточному фенотипу (например, характеризующемуся избыточной пролиферацией), который возникает вследствие изменения на любом этапе пути трансдукции сигналов Hedgehog, включая
5 (но не ограничиваясь только ими) модификацию или мутацию самого Hedgehog. Например, опухолевая клетка, характеризующаяся аномально высокой скоростью пролиферации, обусловленной активацией пути передачи сигналов Hedgehog, может иметь фенотип «усиления по доминантно-негативному типу функции Hedgehog» даже в том случае, когда Hedgehog, присутствующий в данной клетке, не является мутантным.

10 Понятие «потеря функции Patched» относится к аномальной модификации, амплификации или мутации гена или белка Ptc, или к снижению уровня экспрессии гена, что приводит к фенотипу, сходному с фенотипом, обусловленным контактом клетки с белком Hedgehog, например, к аномальной активации пути Hedgehog. «Потеря функции» может включать потерю (утрату) способности гена Ptc осуществлять
15 регуляцию уровня экспрессии генов Gli, например, Gli1, Gli2 и Gli3.

Понятие «усиление по доминантно-негативному типу функции Gli» относится к аномальной модификации, амплификации или мутации гена или белка Gli, или к повышению уровня экспрессии гена, что приводит к фенотипу, сходному с фенотипом, обусловленным контактом клетки с белком Hedgehog, например, к аномальной
20 активации пути Hedgehog.

Понятие «ингибировать» или «ингибирование» в контексте роста опухоли или роста опухолевых клеток относится к замедлению возникновения первичных или вторичных опухолей, замедлению развития первичных или вторичных опухолей, уменьшению частоты возникновения первичных или вторичных опухолей, замедлению или снижению
25 серьезности вторичных воздействий заболевания, или к прекращению роста опухоли и к регрессу опухолей. Понятие «предупреждать» или «предупреждение» относится к полному ингибированию развития первичных или вторичных опухолей или любых вторичных воздействий заболевания. В контексте модулирования различных видов ферментативной активности ингибирование обозначает обратимое подавление или
30 снижение ферментативной активности, включая конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное ингибирование. Указанные типы ингибирования можно различать экспериментальным путем по воздействиям ингибитора на кинетические реакционные характеристики фермента, которые можно анализировать в терминах основного уравнения Михаэлиса-Ментен. Конкурентное ингибирование имеет место в том случае,
35 когда ингибитор может объединяться со свободным ферментом таким образом, что он конкурирует с обычным субстратом за связывание с активным сайтом. Конкурентный ингибитор обратимо взаимодействует с ферментом с образованием комплекса фермент-ингибитор [EI], аналогичного комплексу фермент-субстрат.

Понятие «усиление по доминантно-негативному типу функции Smoothened» относится
40 к аномальной модификации или мутации гена или белка Smo, или к повышению уровня экспрессии гена, что приводит к фенотипу, сходному с фенотипом, обусловленным контактом клетки с белком Hedgehog, например, к аномальной активации пути Hedgehog.

В контексте настоящего описания понятия «ингибитор Smoothened» (или «антагонист Smoothened» или аналогичные выражения) относятся к агентам, обладающим
45 способностью ингибировать Smoothened, оказывать на него антагонистическое воздействие или прекращать его функцию, приводя тем самым к ингибированию пути передачи сигналов Hedgehog, оказанию на него антагонистического воздействия или к прекращению передачи его сигналов. Ингибиторы Smoothened включают (но не

ограничиваясь только ими) циклопамин, джервин, соединения формулы I (например, соединение формулы (Ia), (Ib) или (Ic)), соединения формулы II, соединения формулы III, любые являющиеся антагонистами Smoothened соединения, конкретно перечисленные в настоящем описании, антитела к Smo, нуклеиновые кислоты, являющиеся
 5 ингибиторами Smo (например, siРНК, являющиеся антагонистами Smo). К ингибиторам Smoothened относятся также и другие известные в данной области и/или включенные в настоящее описание в качестве ссылки агенты, являющиеся антагонистами Smoothened.

В контексте настоящего описания понятие «ингибитор Р13К» относится к агентам, обладающим способностью ингибировать, оказывать антагонистическое воздействие
 10 или прекращать связанную с Р13К биологическую активность и активность низлежащих эффекторов, например, активацию Р13К-пути. В контексте настоящего описания к ингибиторам Р13К можно относить также агенты, обладающие способностью ингибировать низлежащие мишени Р13К, такие как PDK1, Akt и mTOR (мишень рапамицина в организме млекопитающих).

Ингибиторы Р13К могут включать соединения, часть из которых представлена в настоящем описании как соединения формулы А и В. Ингибиторы Р13К могут включать также ингибиторы липидкиназы и нуклеотиды, обладающие ингибирующей активностью
 15 в отношении Р13К, такие как siРНК. К ингибиторам Р13К могут относиться также соединения, описанные в публикации РСТ WO 2006/122806 (например, соединение, представляющее собой 2-метил-2-[4-(3-метил-2-окс-8-хинолин-3-ил-2,3-дигидро имидазо
 20 [4,5-с]хинолин-1-ил)-фенил]пропионитрил, т.е. Соединение В; и, например, соединение, представляющее собой 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметилфенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-2-он), т.е. Соединение С), содержание указанной публикации включено в настоящее описание в качестве ссылки.
 25 Ингибиторы Р13К могут представлять собой также соединения, описанные в публикации РСТ WO 07084786 (например, соединение, представляющее собой 5-(2,6-диморфолин-4-илпиримидин-4-ил)-4-трифторметилпиридин-2-иламин, т.е. Соединение А), содержание указанной публикации включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Ингибиторы Р13К могут представлять собой также соединения, описанные в
 30 публикациях РСТ WO 0712775, WO 07129005, WO 07129048, WO 07129052, WO 07129161, WO 0713271, WO 07122410, WO 07080382, WO 07087395, US 07238730, US 072387646 и WO 07082956, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Ингибиторами Р13К могут являться также такие ингибиторы, как XL-147 и XL-765 (Exelixis™), а также SF-1126 (Semaphore Pharmaceuticals™), PX-866 (фирма Oncothyreon)
 35 и GDC0941 (фирма Roche).

В контексте настоящего описания понятие «ингибитор Gli» относится к агентам, обладающим способностью ингибировать, оказывать антагонистическое воздействие
 40 или прекращать связанную с Gli активность, например, трансактивацию гена. К ингибиторам Gli относятся агенты, которые обладают способностью ингибировать связанную с путем Hedgehog активность (например, аномальную активность, которая обуславливает связанные с Hedgehog нарушения), ассоциированную с активацией низлежащих по отношению к Smoothened компонентов. Примерами ингибиторов Gli являются (но не ограничиваясь только ими) GANT61 (Gli-ANTagonist 61), GANT58, зерумбон, эпоксид зерумбона, стауроспоринон, 6-гидроксистауроспоринон,
 45 арцириафлавин С, 5,6-дигидроксиарцириафлавин А и физалины F и В.

В контексте настоящего описания понятие «лечение» может означать как профилактическое или превентивное лечение, так и терапевтическое или подавляющее
 50 болезнь лечение, включая лечение пациентов, которые имеют риск возникновения

нарушения, указанного в изобретении (например, связанного с Hedgehog нарушения (например, рака)), а также больных пациентов. Указанное понятие включает также лечение с целью замедления прогрессирования заболевания.

5 Понятие «лечение» или «лечить» включает введение соединений или агентов с целью предупреждения или замедления возникновения симптомов, осложнений или биохимических показателей заболевания (например, лейкоза), ослабления симптомов или прекращения или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или нарушения. Лечение может быть профилактическим (с целью предупреждения или замедления возникновения заболевания, или для предупреждения проявления его

10 клинических или субклинических симптомов) или может заключаться в терапевтическом подавлении или ослаблении симптомов после проявления заболевания.

Понятие «лечить» или «лечение» относится также к прекращению роста опухоли и к частичному или полному регрессу опухолей, и оно включает введение соединений или агентов с целью предупреждения или замедления возникновения симптомов, осложнений или биохимических показателей заболевания (например, рака), ослабления

15 симптомов или прекращения или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или нарушения.

В контексте настоящего описания «малая органическая молекула» означает органическое соединение (или органическое соединение в комплексе с неорганическим соединением (например, с металлом)), которое имеет молекулярную массу менее 3 кДа

20 и предпочтительно менее 1,5 кДа.

Понятие «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые являются физиологически переносимыми и, как правило, не вызывают аллергическую или аналогичную нежелательную реакцию, такую как

25 желудочное расстройство, головокружение и т.п., при введении человеку. В контексте настоящего описания предпочтительно понятие «фармацевтически приемлемый» означает разрешенный регулирующим агентством Федерального правительства или правительства штата или упомянутый в Фармакопее США, или в другой общепринятой фармакопее для применения на животных и более конкретно на человеке.

30 Понятие «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, вместе с которым вводят соединение. Указанные фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтяное масло, масла животного, растительного происхождения или синтетические, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное

35 масло и т.п. Воду или водные физиологические растворы и водную декстрозу, и глицериновые растворы предпочтительно применяют в качестве носителей, прежде всего для инъеклируемых растворов. Приемлемые фармацевтические носители описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» под ред. E.W.Martin.

Понятие «терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего описания

40 означает количество, достаточное для снижения по меньшей мере примерно на 15%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно достаточное для предупреждения клинически значимого нарушения активности, функции или ответа хозяина. В альтернативном варианте терапевтически эффективное количество является достаточным для улучшения

45 клинически значимого состояния/симптома у хозяина.

Понятие «агент» или «тест-агент» включает любую субстанцию, молекулу, элемент, соединение, единицу или их комбинацию. Оно включает (но не ограничиваясь только ими), например, белок, полипептид, малую органическую молекулу, полисахарид,

полинуклеотид и т.п. Оно может относиться к продукту естественного происхождения, синтетическому соединению или химическому соединению, или к комбинации двух или большего количества субстанций. Если не указано иное, то понятия «агент», «субстанция» и «соединение» можно использовать взаимозаменяемо.

5 Понятие «аналог» в контексте настоящего описания относится к малому органическому соединению, нуклеотиду, белку или полипептиду, который обладает сходной или идентичной активностью или функцией(ями) с соединением, нуклеотидом, белком или полипептидом, обладающим требуемой активностью и терапевтическим
10 действием, предлагаемым в изобретении (например, ингибирование роста опухолей), но указанная субстанция не должна обязательно содержать последовательность или структуру, которая подобна или идентична последовательности или структуре, являющейся предпочтительным вариантом осуществления изобретения.

Понятие «апоптоз» относится к запрограммированной гибели клеток, которая отличается определенными изменениями клеточных характеристик, такими как вздутия
15 мембраны, конденсация и фрагментация хроматина, образование апоптозных телец и позитивная схема окрашивания по методу TUNEL (TUNEL-позитивное окрашивание). Расщепление геномной ДНК в процессе апоптоза приводит к образованию характерных фрагментов ДНК, соизмеримых с размером нуклеосомы; такое расщепление приводит к возникновению диагностического рисунка в виде «лестницы» с размерами фрагментов
20 (примерно) 180 пар оснований, проявляющегося при анализе методом геле-электрофореза. На более поздней стадии процесса апоптоза происходит расщепление плазматической мембраны, приводящее к тому, что апоптозные клетки становятся проницаемыми для различных красителей (например, трипанового синего и пропидия йодида).

25 Понятие «производное» относится либо к соединению, белку или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность родительского белка или полипептида, которая изменена путем интродукции замен, делеций или добавлений аминокислотных остатков, либо к нуклеиновой кислоте или нуклеотиду, модифицированной/модифицированному либо путем интродукции нуклеотидных замен
30 или делеций, добавлений, либо путем мутаций. Производное нуклеиновой кислоты, нуклеотида, белка или полипептида обладает подобной или идентичной функцией с родительским полипептидом.

Понятие «ингибиторы» или «антагонисты» относится к обладающим ингибирующей активностью молекулам, выявленным с помощью анализов *in vitro* и *in vivo* функции
35 Hh-пути, например к антагонистам Smo. В частности, ингибиторы или антагонисты представляют собой соединения или агенты, которые снижают передачу сигнала, имеющую место в пути Hh. Ингибиторами могут являться соединения, которые снижают, блокируют или препятствуют передаче сигнала посредством этого пути.

В контексте настоящего описания понятие «связанное(ые) с Hedgehog нарушение(я)»
40 включает нарушения, ассоциированные с нарушением или аномалией пути Hedgehog, а также нарушения, ассоциированные с нормальными, но нежелательными состояниями роста, связанными с активацией пути Hedgehog. Понятие «связанное(ые) с Hedgehog нарушение(я)» включает (но не ограничиваясь только ими) образование опухоли, рак, неоплазию, злокачественные гиперпролиферативные нарушения и незлокачественные
45 гиперпролиферативные нарушения. Понятие «связанное(ые) с Hedgehog нарушение(я)» включает также доброкачественную гиперплазию предстательной железы, псориаз, «мокрую» дегенерацию желтого пятна, остеопетроз и нежелательный рост волос (гипертрихоз).

В контексте настоящего описания понятие «рак» включает плотные опухоли у млекопитающих, а также гематологические злокачественные заболевания. К «плотным опухолям у млекопитающих» относятся различные виды рака головы и шеи, легкого, мезотелиома, рак средостения, пищевода, желудка, поджелудочной железы, гепатобилиарной системы, тонкого кишечника, ободочной кишки, колоректальный рак, рак прямой кишки, ануса, почки, мочеиспускательного канала, мочевого пузыря, предстательной железы, полового члена, яичек, гинекологических органов, яичника, молочной железы, эндокринной системы, кожи, центральной нервной системы, включая головной мозг; саркомы мягких тканей и кости; и меланомы кожного и внутриглазного происхождения. Понятие «гематологические злокачественные заболевания» включает лейкозы и лимфомы у детей, болезнь Ходжкина, лимфомы лимфоцитарного и кожного происхождения, острый и хронический лейкозы, неоплазму плазматических клеток и различные типы рака, ассоциированные со СПИДом. Кроме того, можно лечить рак, находящийся на любой стадии развития, например первичный, метастатический и рекуррентный рак. Информацию касательно многочисленных типов рака можно почерпнуть, например, в Американском Онкологическом Обществе или, например, в Harrison's Principles of Internal Medicine, под ред. Wilson и др., 12-е изд., изд-во McGraw-Hill, Inc., 1991. Подразумевается, что рассматриваемые подходы можно применять как для человека, так и в ветеринарии.

К типам рака, для лечения которых наиболее пригодны способы, предлагаемые в изобретении, относятся (но не ограничиваясь только ими) глиомы, медуллобластомы (например, медуллобластомы мозжечка), пероцитомы, примитивные нейроэктодермальные опухоли (PNETS), базально-клеточная карцинома (BCC), различные типы мелкоклеточного рака легкого, различные типы крупноклеточного рака легкого, опухоли желудочно-кишечного тракта, рабдомиосаркомы, рак молочной железы, саркомы мягких тканей, опухоли поджелудочной железы, опухоли мочевого пузыря и опухоли предстательной железы.

В контексте настоящего описания понятие «чувствительные опухоли» обозначает опухоли (например, медуллобластомы), которые в результате активации пути Hedgehog отвечают на лечение с использованием ингибитора в качестве противораковой терапии.

В контексте настоящего описания понятие «устойчивые опухоли» обозначает опухоли (например, медуллобластомы), которые ранее были чувствительными, но которые в условиях непрерывного присутствия ингибитора *smo* либо возобновили рост после уменьшения размера, обусловленного лечением, либо возникли вновь после временного исчезновения, обусловленного лечением. Устойчивые опухоли характеризуются пониженной чувствительностью или отсутствием ответа на ингибирование *Smoothed*. Успешное лечение устойчивых опухолей может, например, породить повышенную чувствительность опухолевой клетки к новой или ранее опробованной схеме противораковой терапии и/или химиотерапевтическим средствам, и может приводить, например, к последующей гибели опухолевых клеток и предупреждению метастазирования.

В контексте настоящего описания понятие «статины» относится к любому классу лекарственных средств, которые обладают способностью ингибировать играющий ключевую роль фермент, участвующий в синтезе холестерина, и стимулировать связывание рецептора ЛПНП-холестерина, приводя к снижению уровней холестерина и ЛПНП-холестерина и к повышению уровней ЛПВП-холестерина в сыворотке. Их часто классифицируют как поднабор ингибиторов пути синтеза стерина (SSPI), и они снижают уровни холестерина в сыворотке в результате ингибирования HMG-CoA-

редуктазы, фермента, играющего ключевую роль в биосинтезе холестерина. К статинам относятся правастатин, симвастатин, ловастатин, флувастатин, аторвастатин, церивастатин, росувастатин и питаваастатин.

В контексте настоящего описания понятие «злокачественное(ые) гиперпролиферативное(ые) нарушение(я)» включает (но не ограничиваясь только ими) различные типы рака, нейронные пролиферативные нарушения, пролиферативные заболевания костного мозга и лейкозы.

В контексте настоящего описания понятие «незлокачественное(ые) гиперпролиферативное(ые) нарушение(я)» включает (но не ограничиваясь только ими) незлокачественные и не относящиеся к неопластическим пролиферативные нарушения, такие как гладкомышечная гиперплазия в кровеносных сосудах, кожное рубцевание и фиброз легкого.

В контексте настоящего описания понятие «ингибитор пути биосинтеза холестерина» относится к агентам, которые обладают способностью ингибировать или прекращать образование или синтез холестерина, который, например, начинается в цитоплазме и митохондриях с превращения несущей два атома углерода ацетатной группы ацетил-СoА. Биосинтез холестерина строго регулируется для предупреждения сверхнакопления и аномального отложения холестерина в организме (что может, среди прочего, приводить к сердечнососудистому заболеванию). К ингибиторам этого пути относятся соединения из класса ингибиторов пути синтеза стерина (SSPI), которые включают (но не ограничиваясь только ими) (I) статины; (II) зарагозовую кислоту А (ZGA), представляющую собой ингибитор синтеза сквалена, который блокирует превращение изопреноидов в стерин, не оказывая при этом влияния на синтез изопреноида; кетоконазол, который не влияет на синтез раннего представителя стероидов, ланостерина, но препятствует синтезу последующих стероидов; (IV) трипанолол (TPL), который блокирует конечную стадию синтеза холестерина, но не оказывает влияния на производство других стероидов, отличных от холестерина и его производных; и (V) аминоклутетимид, который блокирует превращение холестерина в регненелон и другие стероиды, но не оказывает влияния на синтез стерина.

Понятие «алкил» относится к углеводородным группам с прямой или разветвленной цепью, которые имеют от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно к (низш.)алкилу, имеющему от 1 до 7 атомов углерода. Примерами алкильных групп являются метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, пентил, гексил, изгексил, гептил, 4,4-диметилпентил, октил и т.п. Предпочтительным является C₁-C₄алкил.

Понятие «низший» («низш.») в контексте настоящего описания применительно к органическим радикалам или соединениям соответственно, как правило, означает, если не указано иное, наличие вплоть до и включительно 7, предпочтительно вплоть до и включительно 4 атомов углерода и наиболее предпочтительно 1 или 2 атома углерода. Он может иметь прямую или разветвленную цепь.

Понятие «необязательно замещенный алкил» относится к незамещенным или замещенным углеводородным группам с прямой или разветвленной цепью, которые имеют от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно к (низш.)алкилу, имеющему от 1 до 7 атомов углерода. Примерами незамещенных алкильных групп являются метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, пентил, гексил, изогексил, гептил, 4,4-диметилпентил, октил и т.п.

Понятие «замещенный алкил» относится к алкильным группам, замещенным одной или несколькими из следующих групп: галоген (например, F, Cl, Br и I), гидроксигруппа, алкоксигруппа, алкоксиалкоксигруппа, арилоксигруппа, циклоалкил, алканоил,

алканоилоксигруппа, аминогруппа, замещенная аминогруппа, алканоиламиногруппа, тиол, алкилтиогруппа, арилтиогруппа, алкилтионогруппа, алкилсульфонил, арилсульфонил, гетероарилсульфонил, аминосульфони́л, нитрогруппа, цианогруппа, карбоксигруппа, карбамил, алкоксикарбонил, арил, аралкоксигруппа, гуанидиногруппа, гетероцикл (например, индолил, имидазолил, фурил, тиенил, тиазолил, пирролидил, пиридил, пиримидил) и т.п.

Понятие «галоген» или «гало» означает фтор, хлор, бром и йод.

Понятие «алкоксигруппа» или «алкилоксигруппа» означает группу алкил-О-.

Понятие «арил» или «ар» означает карбоциклические моноциклические или бициклические ароматические углеводородные группы, которые имеют от 6 до 12 атомов углерода в кольцевом фрагменте, такие как фенильная, нафтильная, тетрагидронафтильная и бифенильная группы, каждая из которых необязательно может быть замещена 1-4, например, 1-2 заместителями, такими как алкил, галоген, трифторметил, гидроксигруппа, алкоксигруппа, алканоил, алканоилоксигруппа, аминогруппа, замещенная аминогруппа, алканоиламиногруппа, тиол, алкилтиогруппа, нитрогруппа, цианогруппа, карбоксигруппа, карбоксиалкил, карбамил, алкоксикарбонил, алкилтионогруппа, алкилсульфонил, аминосульфони́л и т.п. Понятие «арилен» обозначает двухвалентный радикал, образованный из арильной группы.

Понятие «аралкил» означает арильную группу, связанную с алкильной группой, такую как бензил.

Понятие «галоалкил» означает алкил, имеющий в качестве заместителя(ей) один или несколько атомов галогена, такой как трифторметоксигруппа.

Понятие «алкилен» относится к прямоцепочечному мостику, состоящему из 1-6 атомов углерода, связанных простой связью (например, $-(\text{CH}_2)_x-$, где x обозначает 1-6), который может быть замещен 1-3 (низш.) алкильными группами.

Понятие «алкилен, несущий встроенный O, S, N- (H, алкил или аралкил)» означает прямую цепь, состоящую из 2-6 атомов углерода, в которую встроен O, S, N- (H, алкил или аралкил), например, (мета)этиленокси(мета)этилен, (мета)этилентио(мета)этилен или (мета)этиленимино(мета)этилен.

Понятие «циклоалкил» обозначает насыщенные или частично ненасыщенные моноциклические, слитые бициклические или соединенные мостиком полициклические кольцевые системы, содержащие указанное количество кольцевых атомов. Например, C₃-C₁₀циклоалкил включает циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.д.

Понятие «алканоилоксигруппа» обозначает алкил-C(O)-O-.

Понятия «алкиламиногруппа» и «диалкиламиногруппа» обозначают (алкил)NH- и (алкил)₂N- соответственно.

Понятие «алканоиламиногруппа» обозначает алкил-C(O)-NH-.

Понятие «алкилтиогруппа» обозначает алкил-S-.

Понятие «алкилтионогруппа» обозначает алкил-S(O)-.

Понятие «алкилсульфонил» означает алкил-S(O)₂-.

Понятие «карбамил» обозначает -C(O)-аминогруппу или -C(O)-замещенную аминогруппу.

Понятие «алкоксикарбонил» обозначает алкил-O-C(O)-.

Понятие «ацил» обозначает алканоил, ароил, гетероароил, арилалканоил, гетероарилалканоил и т.п.

Понятие «гетероарил» или «гетероар» означает ароматический гетероцикл, например,

моноциклический или бициклический гетероциклический арил, такой как пирролил, паразолил, имидазолил, оксазолил, тиазолил, изооксазолил, изотиазолил, фурил, тиенил, пиридил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил, индолил, бензотиазолил, бензоксазолил, бензотиенил, хиолинил, изохиолинил, бензимидазолил, бензофурил и т.п.,

5 необязательно замещенный 1-4, например, 1-2 заместителями, такими как (низш.)алкил, (низш.)алкоксигруппа или галоген, точка присоединения указанного гетероцикла находится на атоме углерода гетероциклического кольца. Предпочтительными гетероарильными остатками являются 1-метил-2-пирролил, 2-, 3-тиенил, 2-тиазолил, 2-имидазолил, 1-метил-2-имидазолил, 2-,3-,4-пиридил или 2-хиолил.

10 Понятие «гетероциклоалкил» обозначает циклоалкил, как он указан в настоящем описании, при условии, что один или несколько указанных кольцевых атомов углерода замещены фрагментом, выбранным из ряда, включающего -O-, -N=, -NR-, -C(O)-, -S-, -S(O) - или -S(O)₂-, где R обозначает водород, C₁-C₄алкил или азотзащитную группу. Например, в контексте настоящего описания понятие C₃-C₈гетероциклоалкил,

15 используемое при описании комбинаций, предлагаемых в изобретении включает морфолиногруппу, пирролидинил, пирролидинил-2-он, пиперазинил, пиперидинил, пиперидинилон, 1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]дец-8-ил, тиоморфолиногруппу, сульфано-морфолиногруппу, сульфано-морфолиногруппу и т.д.

20 Понятие «алканоил» означает, например, C₁-C₄алканоил, прежде всего C₂-C₅алканоил, такой как ацетил, пропионил или пивалоил.

Понятие «аралкоксигруппа» означает арильную группу, связанную с алкоксигруппой. Понятие «арилсульфонил» означает арил-SO₂-.

Понятие «ароил» означает арил-CO-.

25 Понятие «гетероциклил» обозначает необязательно замещенную, полностью насыщенную или ненасыщенную, ароматическую или неароматическую циклическую группу, например, которая представляет собой 4-7-членную моноциклическую, 7-11-членную бициклическую или 10-15-членную трициклическую кольцевую систему, которая имеет по меньшей мере один гетероатом по меньшей мере в одном содержащем атом

30 углерода кольце. Каждое кольцо гетероциклической группы, содержащее гетероатом, может включать 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из атомов азота, атомов кислорода и атомов серы, где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены и гетероатомы азота необязательно могут быть кватернизованы. Гетероциклическая группа может быть присоединена к любому гетероатому или атому углерода.

35 Примерами моноциклических гетероциклических групп являются пирролидинил, пирролил, пиразолил, оксетанил, пиразолинил, имидазолил, имидазолинил, имидазолидинил, оксазолил, оксазолидинил, изоксазолинил, изоксазолил, тиазолил, тиадиазолил, тиазолидинил, изотиазолил, изотиазолислинил, фурил, тетрагидрофурил, тиенил, оксадиазолил, пиперидинил, пиперазинил, 2-оксопиперазинил, 2-

40 оксопиперидинил, 2-оксопирролодинил, 2-оксоазепинил, азепинил, 4-пиперидонил, пиридил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил, тетрагидропиранил, морфолинил, тиаморфолинил, тиаморфолинилсульфоксид, тиаморфолинилсульфон, 1,3-диоксолан и тетрагидро-1,1-диоксо-тиенил и т.п.

45 Примерами бициклических гетероциклических групп являются индолил, бензотиазолил, бензоксазолил, бензотиенил, хинуклидинил, хиолинил, тетрагидроизохиолинил, изохиолинил, бензимидазолил, бензопиранил, индолизинил, бензофурил, хромонил, кумаринил, энзопиранил, циннолинил, хиноксалинил, индазолил, пирролопиридил, фуропиридинил (такой как фуро[2,3-с]пиридинил, фуро[3,2-б]

пиридинил] или фуоро[2,3-*b*]пиридинил), дигидроизоиндолил, дигидрохиназолинил (такой как 3,4-дигидро-4-оксохиназолинил) и т.п.

Примерами трициклических гетероциклических групп являются карбазолил, бензидолил, фенантролинил, акридинил, фенантридинил, ксантенил и т.п.

5 Понятие «гетероцикл» относится также к замещенным гетероциклическим группам. Замещенные гетероциклические группы представляют собой гетероциклические группы, замещенные 1, 2 или 3 из следующих заместителей:

- (а) алкил;
- (б) гидроксигруппа (или защищенная гидроксигруппа);
- 10 (в) галоген;
- (г) оксогруппа (т.е. =O);
- (д) аминогруппа или замещенная аминогруппа;
- (е) алкоксигруппа;
- (ж) циклоалкил;
- 15 (з) карбоксигруппа;
- (и) гетероциклооксигруппа;
- (к) алкоксикарбонил, такой как незамещенный (низш.)алкоксикарбонил;
- (л) карбамил, алкилкарбамил, арилкарбамил, диалкилкарбамил;
- (м) меркаптогруппа;
- 20 (н) нитрогруппа;
- (о) цианогруппа;
- (п) сульфонамидогруппа, сульфонамидоалкил или сульфонамидодиалкил;
- (р) арил;
- (с) алкилкарбонилксигруппа;
- 25 (т) арилкарбонилксигруппа;
- (у) арилтиогруппа;
- (ф) арилоксигруппа;
- (х) алкилтиогруппа;
- (ц) формил;
- 30 (ч) арилалкил или
- (ш) арил, замещенный алкилом, циклоалкилом, алкоксигруппой, гидроксигруппой, аминогруппой, алкиламиногруппой, диалкиламиногруппой или галогеном.

Понятие «гетероциклооксигруппа» означает гетероциклическую группу, связанную через кислородный мостик.

35 Понятие «гетероарилсульфонил» обозначает гетероарил-SO₂-.

Понятие «гетероароил» обозначает гетероарил-CO-.

Понятие «ациламиногруппа» обозначает ацил-NH-.

40 Понятие «замещенная аминогруппа» обозначает аминогруппу, замещенную одним или независимо друг от друга двумя заместителями, такими как алкил, аралкил, арил, гетероарил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероаралкил, или замещенную двумя заместителями, такими как (низш.)алкилен или (низш.)алкилен, в который встроен O, S, N- (H, алкил, аралкил) и т.п.

45 В контексте настоящего описания понятие «приведение в контакт» («осуществление контакта») используется в его обычном значении и обозначает объединение двух или большего количества молекул (например, низкомолекулярного органического соединения и полипептида) или объединение молекул и клеток (например, соединения и клетки). Приведение в контакт может иметь место *in vitro*, например, объединение двух или большего количества агентов или объединение соединения и клетки или

клеточного лизата в лабораторной пробирке или в другом контейнере. Приведение в контакт может иметь место также и в клетке или *in situ*, например, приведение в контакт двух полипептидов в клетке при осуществлении коэкспрессии в клетке рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих два полипептида, или в клеточном лизате.

5 Фармацевтически приемлемые соли любых кислотных соединений, являющихся ингибиторами Smoothened, которые применяют в способах, предлагаемых в изобретении, представляют собой соли, образованные с основаниями, а именно катионные соли, такие как соли щелочных и щелочноземельных металлов, например соли натрия, лития, калия, кальция, магния, а также аммониевые соли, например соли аммония,
10 триметиламмония, диэтиламмония и трис(гидроксиэтил)метиламмония.

Аналогично этому, они могут представлять собой кислотно-аддитивные соли, такие как соли минеральных кислот, органических карбоновых и органических сульфоновых кислот, например соляной кислоты, метансульфоновой кислоты, малеиновой кислоты, при наличии основной группы, такой как аминогруппа или пиридил, в качестве части
15 структуры.

Фармацевтически приемлемые соли соединений, являющихся ингибиторами Smoothened, которые применяют в способах, предлагаемых в изобретении, представляют собой, прежде всего, кислотно-аддитивные соли, такие как соли минеральных кислот, органических карбоновых и органических сульфоновых кислот, например соляной
20 кислоты, метансульфоновой кислоты, малеиновой кислоты и т.п., при наличии основной группы, такой как пиридил, в качестве части структуры.

Соединения, являющиеся ингибиторами Smoothened, которые применяют в способах, предлагаемых в изобретении, в зависимости от природы заместителей, несут один или несколько асимметричных атомов углерода и поэтому могут иметь форму рацематов
25 и их (R)- и (S)-энантиомеров. Предпочтительным является более активный энантиомер, как правило, имеющий S-конфигурацию (на атоме углерода находится заместитель NR₆R₇).

Настоящее изобретение основано на открытии того, что пути трансдукции сигналов, регулируемые Hh и/или Smo, можно модулировать с помощью комбинации, включающей
30 ингибиторы Smoothened (такие, например, как циклопамин, джервин, соединения формулы I (например, соединение формулы (Ia), (Ib) или (Ic)), соединения формулы II, соединения формулы III, любые являющиеся антагонистами Smoothened соединения, индивидуально перечисленные в настоящем описании, антитела к Smo, нуклеиновые кислоты, являющиеся ингибиторами Smo (например, siРНК, являющиеся антагонистами
35 Smo)), и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Такая модуляция может иметь место в том случае, когда путь Hh/Smo является активным, несмотря на то что он ранее был подвергнут воздействию антагониста Smoothened (например, в случае устойчивых опухолей). Такая модуляция может иметь место также и в том случае, когда
40 путь Hh/Smo является активным, несмотря на то что он ранее не подвергался воздействию антагониста Smoothened (например, в случае чувствительных опухолей).

Настоящее изобретение относится в целом к диагностированию и лечению патологий, связанных с путем Hedgehog (которые определены ниже и обозначены в настоящем описании как связанное(ые) с Hedgehog заболевание(я)), включая (но не ограничиваясь
45 только ими) образование опухоли, рак, неоплазию и незлокачественные гиперпролиферативные нарушения, и более конкретно к способам ингибирования онкогенеза, роста опухолей и выживания опухолей с применением агентов, в отношении которых известно, что они обладают способностью ингибировать путь передачи

сигналов Hedgehog и Smo, например, ингибиторов Smoothened, в комбинации с одним или несколькими из следующих агентов: (I) ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины); (II) ингибиторы Gli; и/или (III) ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Ингибиторы Smoothened представляют собой класс указанных в
5 настоящем описании соединений, и они включают (но не ограничиваясь только ими) антитела к Smoothened или обладающие ингибирующей активностью нуклеотиды (например, посредством механизма RNAi), соединения формулы I, формулы II или формулы III, или любые из соединений, перечисленных в настоящем описании или включенных в него в качестве ссылки, и другие являющиеся антагонистами Smoothened
10 агенты, известные в данной области и/или включенные в настоящее описание в качестве ссылки. Ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) также представляют собой класс указанных в настоящем описании соединений, и они включают (но не ограничиваясь только ими) соединения формулы A, а также ингибиторы липидкиназы и нуклеотиды, обладающие ингибирующей активностью в отношении PI3K (например,
15 посредством механизма RNAi).

Способы и соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, относятся к ингибированию активации пути передачи сигналов Hedgehog, например, при ингибировании состояний аномального роста, обусловленных такими фенотипами, как потеря функции Ptch, усиление по доминантно-негативному типу функции Hedgehog,
20 усиление по доминантно-негативному типу функции Smoothened или усиление по доминантно-негативному типу функции G1, и они заключаются в том, что приводят в контакт клетку с комбинацией агентов, в отношении которых известно, что они обладают способностью ингибировать путь передачи сигналов Hedgehog и Smo, например, включающей ингибиторы Smoothened и ингибиторы биосинтеза холестерина
25 (например, статины); ингибиторы Gli; и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), в количестве, достаточном для оказания агонистического воздействия, приводящего к нормальной активности Ptch, антагонистического воздействия, приводящего к нормальной активности Hedgehog, или антагонистического воздействия на активность Smoothened (например, с целью осуществления реверсии или контроля
30 аномального состояния роста).

Один из объектов настоящего изобретения относится к способам применения соединений для ингибирования Smo-зависимой активации пути (например, в том случае, когда Smo активируют в присутствии лиганда Hedgehog). Другой объект настоящего изобретения относится к способам применения соединений для ингибирования Hedgehog
35 (лиганд)-независимой активации пути. В конкретных вариантах осуществления изобретения способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для противодействия фенотипическим воздействиям нежелательной активации пути Hedgehog, например, обусловленной мутациями, приводящими к усилению по доминантно-негативному типу функции Hedgehog, потере функции Ptch или усилению
40 по доминантно-негативному типу функции Smoothened, независимо от того, происходит ли активация в присутствии лиганда Hedgehog или без него. Например, способ, предлагаемый в изобретении, может предусматривать приведение в контакт клетки (in vitro или in vivo) с антагонистом Smo, таким как ингибитор Smoothened, в комбинации с ингибиторами пути биосинтеза холестерина (например, статинами), ингибиторами
45 Gli и/или ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), в количестве, достаточном для оказания антагонистического воздействия на Smoothened-зависимую или Smoothened-независимую (т.е. в том случае, когда имеет место активация низлежащих по отношению к Smoothened компонентов пути) передачу сигналов пути Hedgehog в присутствии лиганда

Hedgehog или без него.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам ингибирования синтеза, экспрессии, производства, стабилизации, фосфорилирования, релокализации в клетке, и/или активности белка Smo в клетке *in vitro* или *in vivo*, заключающимся в том, что приводят в контакт указанную клетку или интродуцируют в указанную клетку комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления изобретения осуществляют также ингибирование в клетке *in vitro* или *in vivo* белков, находящихся ниже по отношению к Smo в пути передачи сигналов Hedgehog (например, Gli). Например, помимо указанного выше ингибирования Smoothened можно ингибировать синтез, экспрессию, производство, стабилизацию, фосфорилирование, релокализацию в клетке и/или активность белка(ов) Gli путем приведения в контакт указанной клетки или интродуцирования в указанную клетку комбинации, включающей ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В конкретных вариантах осуществления изобретения белок Smo является активным, несмотря на то, что он был подвергнут ранее воздействию антагониста Smoothened (например, как это имеет место в случае устойчивых опухолей). В других вариантах осуществления изобретения белок Smo ранее не подвергался воздействию антагониста Smoothened.

Способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для регулирования пролиферации и/или дифференцировки клеток *in vitro* и/или *in vivo*, например, в случае формирования ткани из стволовых клеток, или для предупреждения роста гиперпролиферативных клеток. В другом конкретном варианте осуществления изобретения приведение в контакт клетки или интродукция в клетку комбинации, включающей ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), приводит к ингибированию клеточной пролиферации, ингибированию роста и/или выживания опухолевых клеток, и/или ингибированию онкогенеза. Так, еще один конкретный вариант осуществления изобретения относится к способам ингибирования и/или оказания антагонистического воздействия на путь Hh, заключающимся в применении комбинации способов, предлагаемых в изобретении, для опухолевых клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения клеточная пролиферация, рост и/или выживание опухолевых клеток, и/или онкогенез ассоциированы с устойчивыми опухолями. В других вариантах осуществления изобретения клеточная пролиферация, рост и/или выживание опухолевых клеток, и/или онкогенез ассоциированы с чувствительными опухолями.

В конкретных вариантах осуществления изобретения комбинации, предлагаемые в изобретении, можно вводить пациенту, пораженному чувствительными опухолями. В других конкретных вариантах осуществления изобретения комбинации, предлагаемые в изобретении, можно вводить пациенту, пораженному устойчивыми опухолями.

Указанные в настоящем описании опухолевые клетки, для лечения которых можно применять комбинации, предлагаемые в изобретении, могут быть устойчивыми к апоптозу, могут обладать устойчивостью к общепринятым схемам осуществления противораковой терапии, и/или могут относиться к указанным в настоящем описании устойчивым опухолям. Устойчивые опухоли могут возникать, например, в результате генетических изменений, приводящих к реактивации пути Hedgehog несмотря на присутствие ингибиторов Smo. Примерами могут служить мутации Smo, которые

оказывают воздействие на связывание с ингибитором и/или мутации в низлежащих по отношению к Smo генах, которые приводят к реактивации пути Hedgehog (например, *sufu*, *Gli1*, *Gli2*). В случае таких устойчивых опухолей и опухолей, которые не погибают при использовании общепринятых схем осуществления противораковой терапии, комбинации, предлагаемые в изобретении, могут индуцировать в клетках процессы старения, апоптоза или некроза. Введение указанных комбинаций может приводить к гибели клеток и предупреждению метастазирования.

В способах, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять комбинации, которые включают ингибиторы Smoothened, приготовленные в виде фармацевтических препаратов, содержащих фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы *Gli* и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Аналогично этому ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы *Gli* и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) можно включать в состав фармацевтических препаратов, которые содержат также фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. Указанные комбинации можно вводить пациенту с целью лечения состояний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, таких как различные типы рака и/или опухолей (такие как медуллобластома, базально-клеточная карцинома и т.д.), и незлокачественных гиперпролиферативных нарушений. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения указанные комбинации можно вводить пациенту, пораженному чувствительными опухолями. Согласно другим конкретным вариантам осуществления изобретения указанные комбинации можно вводить пациенту, пораженному устойчивыми опухолями, или с целью предупреждения развития устойчивых опухолей.

Другие объекты изобретения относятся к способам диагностирования, предупреждения и/или лечения клеточных истощений, нарушений и/или дисфункций; гиперпластических, гиперпролиферативных и/или злокачественных болезненных состояний; и/или метастазов опухолевых клеток у млекопитающего, которое отличается тем, что в его организме присутствует и/или экспрессируется ген или продукт гена Smo (например, белок Smo), заключающимся в том, что млекопитающему вводят комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы *Gli* и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K).

Путь передачи сигналов Hedgehog

Представители семейства сигнальных молекул Hedgehog опосредуют многие важные распространяющиеся на короткие и длинные расстояния процессы структурирования при развитии позвоночных. Формирование структуры (паттерна) представляет собой вид активности, посредством которой эмбриональные клетки формируют упорядоченные пространственные схемы дифференцированных тканей. Физическая сложность высших организмов возникает в процессе эмбриогенеза благодаря взаимодействию присущей клеткам способности к дифференцировке и присущей клеткам способности передавать сигналы. Индуктивные взаимодействия являются необходимыми для эмбрионального структурирования в процессе развития позвоночных с момента самого раннего формирования плана организма до структурирования систем органов, до образования различных типов клеток в процессе тканевой дифференцировки. Влияния клеточных взаимодействий в процессе развития изменяются: клетки-респондеры переходят от одного пути клеточной дифференцировки к другому в результате индукции клеток, которые отличаются как от находящихся в неиндуцированном состоянии, так

и в индуцированном состоянии клеток-респондеров (индукции). Иногда клетки индуцируют своих соседей дифференцироваться таким же путем, как и они сами (гомеогенетическая индукция); в других случаях клетка осуществляет ингибирующее воздействие, не позволяя своим соседям дифференцироваться таким же путем, как и она сама. Клеточные взаимодействия на ранней стадии развития могут иметь последовательный характер, в результате чего начальная индукция между двумя типами клеток приводит к дальнейшему усилению разнообразия. Кроме того, индуктивные взаимодействия имеют место не только в эмбрионах, но также и между зрелыми клетками, и они могут служить как для упрочения и поддержания морфогенетической структуры, так и для индукции дифференцировки.

Семейство генов Hedgehog позвоночных включает три члена, которые присутствуют в организме млекопитающих, они известны под названиями Desert Hedgehog (Dhh), Sonic Hedgehog (Shh) и Indian Hedgehog (Ihh), все они кодируют секретлируемые белки. Эти различные белки Hedgehog состоят из сигнального пептида, высококонсервативной N-концевой области и более вариабельного C-концевого домена. Биохимические исследования позволили установить, что аутопротеолитическое расщепление белка предшественника Hh происходит посредством образования промежуточного продукта в виде сложного тиоэфира, который затем расщепляется с нуклеофильным замещением. По-видимому, нуклеофил представляет собой малую липофильную молекулу, которая ковалентно связывается с C-концевой областью N-пептида, прикрепляя его к клеточной поверхности. Биологическое значение является очень важным. В результате прикрепления на поверхности продуцирующих Hedgehog клеток создается высокая местная концентрация N-концевого пептида Hedgehog. Он представляет собой N-концевой пептид, который является необходимым и достаточным для обеспечения активности в отношении передачи сигналов Hedgehog на короткие и длинные расстояния.

Smoothened (Smo) кодирует состоящий из 1024 аминокислот трансмембранный белок, который функционирует в качестве трансдуктора сигнала Hedgehog (Hh). Белок Smo имеет 7 гидрофобных трансмембранных доменов, внеклеточную аминоконцевую область и внутриклеточную карбоксиконцевую область. Smo обладает определенным сходством с рецепторами, связанными с G-белком, и обладает наибольшей гомологией с семейством серпентиновых (змееподобных) белков Frizzled (Fz) (Alcedo и др., Cell 86, 1996, с.221).

Неактивный путь передачи сигналов Hedgehog имеет место в том случае, когда рецептор трансмембранного белка Patched (Ptc) ингибирует стабилизацию, фосфорилирование и активность Smoothened (Smo). Фактор транскрипции Gli, низлежащий компонент пути передачи сигналов Hh, не может проникать в ядро вследствие взаимодействий с цитоплазматическими белками, включая Fused (Fu) и Suppressor of fused (Sufu). В результате этого подавляется активация транскрипции генов-мишеней Hedgehog. Активация пути инициируется посредством связывания любого из трех присутствующих у млекопитающих лигандов (Dhh, Shh или Ihh) с Ptc.

Связывание лигандов Hh изменяет взаимодействие Smo и Ptc, прекращая подавление Smo, после чего Smo перемещается из внутренних структур клетки к плазматической мембране. Локализация Smo на плазматической мембране запускает активацию генов-мишеней пути Hh, которая является независимой от Hh (Zhu и др., Genes Dev. 17(10), 2003, с.1240). Каскад, активируемый Smo, вызывает транслокацию активной формы фактора транскрипции Gli в ядро. Активация Smo, происходящая благодаря транслокации Gli в ядро, активирует экспрессию генов-мишеней пути Hh, включая Wnts, TGF β и Ptc и сам Gli.

Нарушения, связанные с Hedgehog

В соответствии с вышеизложенным, в настоящем изобретении предложен также способ предупреждения или лечения указанных в настоящем описании любых заболеваний или нарушений (которые каждое индивидуально или все вместе обозначены в настоящем описании также как «связанные с Hedgehog нарушения») у индивидуума, который нуждается в таком лечении, заключающийся в том, что индивидууму вводят комбинацию, включающую ингибиторы Smoothened (циклопамин, джервин, соединения формулы I (например, соединение формулы (Ia), (Ib) или (Ic)), соединения формулы II, соединения формулы III, любое из соединений, являющихся антагонистами Smoothened, индивидуально перечисленных в настоящем описании, антитела к Smo и обладающие ингибирующей активностью в отношении Smo нуклеиновые кислоты (например, обладающие ингибирующей активностью в отношении Smo siРНК)) или их фармацевтически приемлемые соли, и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Для любого из указанных выше применений требуемые дозы должны варьироваться в зависимости от пути введения, конкретного подлежащего лечению состояния и желаемого действия.

Повышенные уровни передачи сигналов Hedgehog (например, аномальная передача сигналов Hedgehog) являются достаточными для инициации возникновения рака и они требуются для выживания опухоли. Возникновение рака и выживание опухоли может быть обусловлено также потерей функции Ptch, усилением по доминантно-негативному типу функции Hedgehog, усилением по доминантно-негативному типу функции Smoothened и/или усилением по доминантно-негативному типу функции Gli. К таким типам рака относятся (но не ограничиваясь только ими) рак предстательной железы (Karhadkar S.S. и др., *Nature*; 431 (7009), 7 октября 2004 г., сс.707-712; Sanchez P. и др., *PNAS*; 101 (34), 24 августа 2004 г., сс.12561-12566; Mimeault M. и др., *International Journal of Cancer*; 118 (4), 2006, сс.1022-1031); рак молочной железы (Kubo M. и др., *Cancer Res.*; 64 (17), 1 сентября 2004 г., сс.6071-6074; Liu S. и др., *Cancer Res*; 66 (12), 2006, сс.6063-6071; (Moraes R.C. и др., *Development*; 134 (6), 2007, сс.1231-1242); медуллобластома (Berman D.M. и др., *Science*; 297 (5586), 30 августа 2002 г., сс.1559-1561); рак кожи немеланомного типа, т.е. плоскоклеточная карцинома (SCO и базально-клеточная карцинома (BCC) (Williams J.A. и др., *PNAS*; 100 (8), 15 апреля 2003 г., сс.4616-1421; Xie J. и др., *Nature.*; 391 (6662), 1 января 1998 г., сс.90-92); рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак желудка и билиарный рак (рак билиарного тракта) (Thayer S.P. и др., *Nature*; 425 (6960), 23 октября 2003 г., сс.851-856; Ma и др., *Int J Cancer* 118 (1), 2006, с.139; Berman D.M. и др., *Nature*; 425(6960), 23 октября 2003 г., сс.846-851; Nakashima H. и др., *Cancer Research*; 66 (14), 2006, сс.7041-7049; Feldmann G. и др., *Cancer Research*; 67 (5), 2007, сс.2187-2196; Ji Z. и др., *J Biol Chem*; 282 (19), 2007, сс.14048-14055) и мелкоклеточный рак легкого (Watkins D.N. и др., *Nature*;422(6929), 20 марта 2003 г., сс.313-317; Vestergaard J. и др., *Lung Cancer*; 52(3), 2006, сс. 281-290).

Другими типами рака, при которых повышенные уровни передачи сигналов Hedgehog являются достаточными для инициации возникновения рака и требуются для выживания опухоли, являются (но не ограничиваясь только ими) рак ободочной кишки (Douard R. и др., *Surgery*; 139 (5), 2006, сс.665-670; Qualtrough D. и др., *International Journal of Cancer*; 110 (6), 2004, сс.831-837); глиома (Bar E.E. и др., *Neuro-Oncology*; 9 (4), 2007, с.594; Clement V. и др., *Current Biology* 17 (2), 2007, сс. 165-172; Ehteshan M. и др., *Oncogene*; 12 марта 2007, Epub до выхода печатного издания); меланома (Stecca B. и др., *PNAS*; 104 (14), 2007, сс. 5895-5900); немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) (Yuan Z. и др., *Oncogene*;

26 (7), 2007, сс. 1046-1055); рак яичника (Chen X.J. и др. Cancer Science; 98 (1), 2007, сс. 68-76); рак печени (Huang S.H. и др., Carcinogenesis; 27 (7), 2006, сс.1334-1340; Sicklick J.K. и др., Carcinogenesis; 27 (4), 2006, сс.748-757); рак почки (Cutcliffe С.и др., Clinical Cancer Research; 11 (22), 2005, сс.7986-7994), рабдомиосаркома (Hahn Н. и др.. Nature Medicine; 4 (5), 1998, сс.619-622; Tostar U. и др. Journal of Pathology; 208 (1), 2006, сс.17-25) и хондросаркома (Tiet T.D. и др., American Journal of Pathology; 168 (1), 2006, сс.321-330).

Злокачественная лимфома (ML) затрагивает клетки лимфатической системы, и она представляет собой пятый по частоте встречаемости рак в США. К ML относятся
10 болезнь Ходжкина и неходжкинские заболевания, представляющие собой гетерогенную группу лимфоидных пролиферативных заболеваний. На долю болезни Ходжкина приходится примерно 14% всех случаев злокачественных лимфом. Неходжкинские лимфомы представляют собой группу разнообразных злокачественных заболеваний, преимущественно В-клеточного происхождения. Согласно схеме, изложенной в Рабочей
15 Классификации (Working Formulation), указанные лимфомы подразделяют на категории низкой, промежуточной и высокой степени злокачественности на основе присущих им характерных свойств (см. «The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project», Cancer 49, 1982, сс.2112-2135). Лимфомы низкой степени злокачественности являются безболезненными (индолентными), в этом случае средняя продолжительность выживания
20 составляет от 5 до 10 лет (Horning и Rosenberg, N. Engl. J. Med. 311, 1984, сс.1471-1475). Хотя химиотерапия может индуцировать ремиссию в большинстве случаев возникновения индолентных лимфом, случаи излечения являются редкими и у большинства пациентов наступает рецидив, требующий дальнейшей терапии. Лимфомы промежуточной и высокой степени злокачественности являются более агрессивными
25 опухолями, но в этом случае имеется более высокий шанс излечения с помощью химиотерапии. Однако у значительной части таких пациентов возникает рецидив и им требуется дальнейшее лечение.

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную опухоль, состоящую из плазматических клеток того типа, который у здорового индивидуума
30 присутствует в костном мозге. Указанные злокачественные плазматические клетки накапливаются в костном мозге и, как правило, продуцируют моноклональные молекулы IgG- или IgA-типа. Злокачественные плазматические клетки возвращаются в костный мозг и размножаются в нем, вызывая анемию и иммуносупрессию вследствие нарушения нормального гематопоза. У индивидуумов, страдающих множественной
35 миеломой, часто наблюдается анемия, остеолитические повреждения, почечная недостаточность, гиперкальциемия и рекуррентные бактериальные инфекции. ММ представляет собой второе по значимости из наиболее распространенных гематопозических злокачественных заболеваний.

Кроме того, к «связанным с Hedgehog нарушениям» относятся различные типы рака
40 кровеносной и лимфатической систем, в том числе лимфомы, лейкозы и миеломы. Способы и комбинации, предлагаемые в изобретении, позволяют оказывать антагонистическое воздействие на один или несколько компонентов пути передачи сигналов Hedgehog, приводя к ингибированию роста и пролиферации клеток лимфомы, лейкозных клеток или клеток миеломы. Лимфома представляет собой злокачественную
45 опухоль, которая состоит из лимфобластов, образовавшихся из В-лимфоцитов. Миелома представляет собой злокачественную опухоль, состоящую из плазматических клеток того типа, который у здорового индивидуума присутствует в костном мозге. Лейкоз представляет собой острое или хроническое заболевание, поражающее кроветворящие

органы. Различные типы NHL характеризуются аномальным увеличением количества лейкоцитов в тканях организма, сопровождающегося или не сопровождающегося увеличением их количества в кровотоке, и их классифицируют по типу лейкоцитов, присутствующему в наибольшем количестве.

5 С помощью способов и комбинаций, предлагаемых в изобретении, можно лечить, например, индивидуумов, страдающих лимфомой или имеющих риск развития лимфомы (например, В-клеточной лимфомы, плазмобластомы, плазмцитомы или CLL). Предпочтительно индивидуум представляет собой человека. Способы и комбинации, предлагаемые в изобретении, предусматривают введение индивидууму фармацевтической
10 композиции, содержащей в эффективном количестве ингибитор Smoothened в комбинации с одним или несколькими из следующих агентов: (I) ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины); и (II) ингибиторы GH. Индивидуум может представлять собой индивидуума, у которого диагностирована лимфома с метастазами или без метастазов, на любой стадии заболевания (например, на стадии с I по IV согласно
15 Системе определения стадий, предложенной в Анн Арборе (Ann Arbor Staging System)). Лимфомами, пригодными для лечения с помощью способов, предлагаемых в изобретении, могут служить (но не ограничиваясь только ими) болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома. Болезнь Ходжкина представляет собой злокачественное нарушение лимфатической ткани (лимфома) у человека, которое, по-видимому,
20 возникает в определенном лимфатическом узле и затем распространяется в селезенку, печень и костный мозг. Заболевание возникает наиболее часто у индивидуумов в возрасте от 15 до 35 лет. Оно характеризуется прогрессирующим безболезненным увеличением лимфатических узлов, селезенки и лимфатической ткани в целом. Классическую болезнь Ходжкина подразделяют на четыре подтипа: (1) болезнь
25 Ходжкина с нодулярным склерозом (NSHD); (2) смешанно-клеточная болезнь Ходжкина (MCHD); (3) болезнь Ходжкина с истощением лимфоцитов (с лимфоидным истощением) (LDHD); и (4) классическая болезнь Ходжкина с большим количеством лимфоцитов (сLRHD).

Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления изобретения
30 способы и комбинации, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для лечения неходжкинской лимфомы (NHL). Неходжкинскую болезнь (лимфому) называют также лимфосаркомой и относят к группе лимфом, которые отличаются от болезни Ходжкина некоторыми важными моментами и которые классифицируют на основе исследования раковых клеток под микроскопом. Неходжкинские лимфомы включают
35 (но не ограничиваясь только ими) (1) характеризующиеся медленным ростом лимфомы и лимфолейкозы (такие, например, как хронический лимфолейкоз, лимфома из малых лимфоцитов, лимфоплазматическая лимфома, лимфома из клеток центра фолликула (фолликулярная лимфома), фолликулярная лимфома из малых клеток с расщепленными ядрами, фолликулярная смешанно-клеточная лимфома, В-клеточная лимфома
40 маргинальной зоны, лейкоз волосковых клеток, плазмацитомы, миелома, лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов, грибовидный микоз, синдром Сезари); (2) лимфомы и лимфолейкозы с умеренной агрессивностью (такие, например, как пролимфоцитарный лейкоз, лимфома из клеток зоны мантии, лимфома из клеток центра фолликула, фолликулярная лимфома из малых клеток с расщепленными ядрами, хронический
45 лимфолейкоз/пролимфоцитарный лейкоз, ангиоцентрическая лимфома, ангиоиммунобластная лимфома); (3) агрессивные лимфомы (такие, например, как крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфомы из периферических Т-клеток, лимфома из Т-клеток кишечника, анапластическая крупноклеточная лимфома); и (4)

высокоагрессивные лимфомы и лимфолейкозы (такие, например, как В-лимфобластный лейкоз/лимфома из предшественников В-клеток, лимфома Беркитта, высокозлокачественная В-клеточная лимфома, Т-лимфобластный лейкоз/лимфома типа Беркитта из предшественников Т-клеток). Способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для лечения лимфом у взрослых и детских форм лимфомы, а также лимфом, находящихся на любой стадии, например на стадии I, II, III или IV. Представленные в настоящем описании способы можно применять также для лечения и других форм лейкоза, например острого лимфолейкоза (ALL).

Некоторые из терапевтических способов и комбинаций, предлагаемых в изобретении, наиболее пригодны для лечения лимфом или миелом, которые не экспрессируют GИЗ. Хотя, по-видимому, экспрессия Gli1 и Gli2 должна иметь место во всех лимфомах, но обнаруживаемый уровень экспрессии Gli3 присутствует в основном в лимфомах, которые являются устойчивыми к ингибированию пути Нн циклопамином. Экспрессия Gli3 отсутствует в здоровых В-клетках селезенки и в большинстве реагирующих на циклопамин лимфом.

Поэтому перед осуществлением лечения с помощью комбинаций и способов, предлагаемых в изобретении, у индивидуумов, имеющих лимфомы, можно сначала проводить анализ экспрессии Gli3 в образце клеток лимфомы, полученном из организма индивидуума. Уровень экспрессии Gli3 в образце можно сравнивать с уровнем экспрессии Gli3 в здоровых В-клетках селезенки, полученных из организма индивидуума. Уровни экспрессии Gli3 в образцах лимфомы или миеломы и в контрольных клетках можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. О вероятном ответе на лечение с помощью способов и комбинаций, представленных в настоящем описании, можно судить по отсутствию обнаруживаемого уровня экспрессии Gli3 в образцах лимфомы или миеломы или по присутствию уровня экспрессии, который лишь незначительно превышает (например, не более чем на 25%, 50% или 100%) уровень экспрессии Gli3 в здоровой В-клетке. Не будучи дополнительной стадией терапевтических способов, предлагаемых в изобретении, предварительный скрининг в отношении отсутствия экспрессии Gli3 может являться независимым способом стратификации пациентов.

Помимо лимфом, способы и композиции, представленные выше, можно применять также для лечения миелом. Множественная миелома представляет собой приводящую к фатальному исходу неоплазму, характеризующуюся накоплением клона плазматических клеток, часто сопровождающимся секрецией Ig-цепей. Инвазия опухоли в костный мозг ассоциирована с анемией, гипогаммаглобулинемией и гранулоцитопенией и сопровождается бактериальными инфекциями. Аномальное содержание цитокинов в окружающей среде, прежде всего повышенные уровни IL-6 и IL-1 β , часто приводят к повышенной остеоклазии, вызывающей боль в кости, к переломам и гиперкальциемии. Несмотря на успехи интенсивной химиотерапии и методов трансплантации, множественная миелома повсеместно является приводящим к фатальному исходу пролиферативным плазматическим нарушением.

Комбинации и способы, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения базально-клеточной карциномы (BCC или базалиомы), опухолей надпочечников, возникающих из коры или сердцевинной части мозгового вещества надпочечников, и опухолей яичника.

У больных людей с синдромом Горлина (который называют также синдромом базально-клеточного невуса (BCNS) и невоидной базально-клеточной карциномой), представляющим собой редко встречающийся обусловленный генетическими факторами

синдром аутосомально-доминантного рака, очень часто развивается базально-клеточная карцинома (ВСС), а другие плотные опухоли (например, медуллобластомы) возникают менее часто вследствие мутаций зародышевой линии, приводящих к потере функции Ptc1. Не следует ожидать, что такие пациенты, а также другие пациенты с ВСС, не имеющие синдрома Горлина, у которых присутствуют соматические мутации, приводящие к потере функции Ptc1, будут реагировать на методы лечения, ассоциированные с лигандами Hedgehog. Однако они должны давать ответ на ингибиторы компонентов пути передачи сигналов Hh, находящихся ниже лигандов Hh, как это было установлено при создании способов и комбинаций, предлагаемых в настоящем изобретении.

Аналогично этому, другие плотные опухоли, которые вследствие мутаций Ptc1 или Smo не реагируют на ингибирование, связанное с лигандами Hh, должны реагировать на блокаду Smo (например, осуществляемую с применением способов и комбинаций, предлагаемых в изобретении).

Комбинацию, включающую ингибиторы Smoothed (например, соединение формулы I, формулы II или формулы III, или любое из соединений, перечисленных в настоящем описании, или включенных в него в качестве ссылки) или их фармацевтически приемлемые соли, и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), предлагаемую в изобретении, можно применять также для лечения связанных с Hedgehog нарушений, включая нарушения, обусловленные избыточным ростом костной ткани. Нарушения, обусловленные избыточным ростом костной ткани, включают (но не ограничиваясь только ими) акромегалию, макроцефалию, синдром Сотоса, прогрессирующую диафизарную дисплазию (PDD или болезнь Камурати-Энгельманна), краниодиафизарную дисплазию и эндостеальные гиперостозные нарушения, в том числе болезнь Ван-Бюхема (типы I и II) и склеростеоз.

Комбинации, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения нежелательного роста волос, например волосяного невуса, и для косметического предупреждения повторного роста волос после эпиляции.

Комбинации, предлагаемые в изобретении, можно применять также для лечения таких связанных с Hedgehog нарушений, как псориаз, для лечения которого, как было установлено, можно применять другие известные ингибиторы пути Hedgehog (например, циклопамин) (Cutis, 78(3): 185-8; Br. J. Dermatology Apr; 154(4), 2006, сс.619-623).

Комбинации, предлагаемые в изобретении, можно применять также для лечения таких связанных с Hedgehog нарушений, как «фиброзные нарушения», прежде всего фиброз печени. Фиброзные нарушения характеризуются избыточной пролиферацией фибробластов или миофибробластов и избыточным производством соединительного тканевого матрикса, включая коллаген, фибронектин и глюкозаминогликаны (GAG). К фиброзным нарушениям печени относятся (но не ограничиваясь только ими) алкогольный, ассоциированный с гепатитом C и первичный билиарный фиброз, а также неалкогольный стеатоз, склерозирующий холангит и фиброз, обусловленный шистосомозом.

Передача сигналов Hedgehog имеет важное значение для дифференцировки Т-клеток о чем свидетельствует по меньшей мере тот факт, что мыши линии Shh-/- имеют малый размер тимуса и характеризуются пониженной дифференцировкой Т-клеток от двойного негативного до двойного позитивного типа. Было установлено, что помимо влияния на пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников Т-клеток передача сигналов Hh модулирует передачу сигнала Т-клеточными рецепторами в процессе

отбора популяции. Следовательно, способы и комбинации, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения и диагностирования ассоциированных с Т-клетками нарушений, таких как аутоиммунные и воспалительные заболевания и преодоление опухолями воздействий иммунной системы.

5 Факторы транскрипции Gli

Содержащие домены, которые называют «цинковыми пальцами», факторы транскрипции Gli1, Gli2 и Gli3 являются конечными эффекторами пути передачи сигналов Hedgehog, к которым Smoothened осуществляет трансдукцию своего сигнала после прекращения ингибирующего воздействия Patched (например, после связывания с лигандом Hedgehog). Gli участвует в онкогенезе, и его конститутивная активация имеет решающее значение для развития рака (Lauth M. и др., PNAS 104(20), 2007, с.8455).

Представленные в настоящем описании данные позволяют сделать предположение о том, что амплификация низлежащего фактора транскрипции Gli2 может обуславливать реактивацию пути Hedgehog несмотря на присутствие ингибиторов smo (что может приводить, например, к образованию устойчивых опухолей). Можно предположить, что ингибиторы, которые действуют на Gli1 или Gli2, ингибируют рост устойчивых опухолей, прежде всего при их применении в комбинации с ингибиторами Smoothened согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении.

Известные ингибиторы Gli, которые можно применять в комбинированных способах, предлагаемых в изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) низкомолекулярные антагонисты Gli GANT61 (Gli-ANTagonist 61) и GANT58 (Laugh M. и др.). Другими известными ингибиторами Gli, которые можно применять в комбинированных способах, предлагаемых в изобретении, могут служить (но не ограничиваясь только ими) сесквитерпены зерумбон и эпоксид зерумбона; бисиндольные алкалоиды стауроспоринон, 6-гидроксистауроспоринон, арцириафлавин С и 5,6-дигидроксиарцириафлавин А; и физалины F и В (Hosoya T. и др., ChemBioChem 9, 2008, с.1082).

PI3K

Фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) представляют собой широко распространенные липидкиназы, которые фосфорилируют фосфоинозитиды в положении D-3 инозитольного кольца. Эти белки функционируют в качестве трансдукторов сигнала, передавая его от рецепторов клеточной поверхности низлежащим компонентам. Продукты катализируемых PI3K реакций, такие как фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PtdIns(3,4,5)P3), фосфатидилинозитол 3,4-бисфосфат (PtdIns(3,4)P2) и фосфатидилинозитол-3-фосфат (PtdIns(3)P), представляют собой вторичные мессенджеры, которые играют центральные роли в многочисленных клеточных процессах, включая рост, дифференцировку, подвижность, пролиферацию и выживание клеток.

Восемь представителей семейства PI3K были подразделены на три группы на основе их первичной последовательности, избирательности *in vitro* в отношении субстрата, структуры домена и формы регуляции. PI3K класса II преимущественно ассоциированы с мембранными фракциями клеток, они отличаются наличием C2-домена на своем С-конце и включают три изоформы (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β и PI3K-C2 γ) (Sheikh и др., BMC Clin. Pathol. 3, 2003, с.1). PI3K класса III используют в качестве субстрата только фосфатидилинозитол, и они играют важную роль в графике белка через лизосому (Volinia и др., EMBO J. 14, 1995, с.3339).

PI3K класса I, которые применяют в способах и комбинациях, предлагаемых в настоящем изобретении, подразделяют на две подгруппы, а именно IA и IB. Подгруппа PI3K класса IA включает каталитические субъединицы p110 α , p110 β и p110 δ , которые

образуют гетеродимеры с одним из пяти регуляторных доменов: p85 α , p85 β , p85 γ , p50 α и p55 α . Указанные PI3K активируются тирозинкиназами рецептора клеточной поверхности.

Класс IB PI3K состоит из одного представителя, а именно, гетеродимера p110g и регуляторного домена p101, который активируется пу-субъединицами G-белков после стимуляции связанных с G-белком рецепторов. PI3K класса IA и класса IB катализируют образование PtdIns(3,4,5)P₃, действие липидфосфатазы PTEN приводит к реверсии этого процесса.

Путь синтеза холестерина

Одной из причин, по которой путь Hedgehog и путь биосинтеза холестерина оказываются связанными друг с другом, является то, что синтез стерина необходим для трансдукции сигналов Shh (Corcoran R. и Scott M., PNAS 103(22), 2006, с.8409). Когда нарушается синтез стерина, то происходит не только ковалентная модификация лиганда Shh холестерином, но также может блокироваться в пути Hedgehog передача сигнала Shh в получающие его клетки (Cooper M. и др., Science 280, 1998, с.1603). В данной области известны противоопухолевые действия статинов, и в настоящее время в клинических опытах проверяют возможность применения нескольких статинов при раке. На основе результатов исследований, проведенных с применением ингибиторов синтеза холестерина из класса статинов, было выдвинуто предположение о наличии связи между холестерином и раком (Bar E. и Stearns D., Expert Opin. Investig. Drugs 17(2), 2008, с.185). Статины связывают HMG-CoA (т.е. фермент, представляющий собой 3-гидрокси-3-глутарил-кофермент А)-редуктазу примерно в 1000 раз более эффективно, чем природные субстраты.

Комбинации, включающие ингибиторы Smoothened в сочетании с ингибиторами пути биосинтеза холестерина, ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и/или ингибиторами Gli.

В изобретении предложены комбинации, включающие ингибиторы Smoothened (например, соединение формулы I, формулы II или формулы III, или любое из соединений, перечисленных в настоящем описании или включенных в него в качестве ссылки) и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Такая комбинация может находиться в форме фармацевтических комбинаций, например в форме набора, содержащего а) первый агент, представляющий собой указанные в настоящем описании ингибиторы Smoothened (например, соединение формулы I, формулы II или формулы III, или любое из соединений, перечисленных в настоящем описании или включенных в него в качестве ссылки) в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, и б) по меньшей мере один коагент, представляющий собой ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины) и/или ингибиторы Gli. Набор может содержать инструкции по введению.

Комбинации, предлагаемые в изобретении, могут обладать синергетическими действиями, т.е. терапевтические действия комбинации, включающей ингибиторы Smoothened (например, соединение формулы I, формулы II или формулы III, или любое из соединений, перечисленных в настоящем описании или включенных в него в качестве ссылки) и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), могут быть существенно выше терапевтических воздействий, оказываемых каждым ингибитором при его индивидуальном применении, или даже больше ожидаемого при их объединении действия (если считать, что оно является лишь аддитивным). В некоторых вариантах

осуществления изобретения входящие в комбинацию агенты вводят одновременно. В других вариантах осуществления изобретения входящие в комбинацию агенты вводят последовательно.

5 Дозы совместно вводимых агентов должны варьироваться в зависимости от конкретного типа применяемого агента, состояния, подлежащего лечению и т.д.

Понятия «совместное введение» или «комбинированное введение», или т.п. в контексте настоящего описания означают введение выбранных терапевтических средств одному пациенту, при этом подразумевается, что они включают схемы лечения, при которых агенты не требуется вводить посредством обязательно только одного и того же пути введения или только в одно и то же время.

Понятие «фармацевтическая комбинация» в контексте настоящего описания означает продукт, полученный в результате смешения или объединения более одного действующего вещества, и оно включает как фиксированные, так и нефиксированные комбинации действующих веществ. Понятие «фиксированная комбинация» означает, что действующие вещества, например ингибитор Smoothened и коагент, оба вводят пациенту одновременно в форме одной единицы или дозы. Понятие «нефиксированная комбинация» означает, что действующие вещества, например ингибитор Smoothened и коагент, оба вводят пациенту в виде отдельных единиц либо одновременно, либо совместно, либо последовательно без определенных временных пределов, при этом такое применение обеспечивает терапевтически эффективные уровни обоих соединений в организме пациента. Последнее применимо также к терапии, основанной на применении смесей, например, предусматривающей введение 3 или большего количества действующих веществ.

Введение и фармацевтические композиции

25 Изобретение относится к применению комбинаций фармацевтических композиций, содержащих ингибиторы Smoothened (например, соединение формулы I, формулы II или формулы III, или любое из соединений, перечисленных в настоящем описании или включенных в него в качестве ссылки) и ингибиторы пути биосинтеза холестерина (например, статины), ингибиторы Gli и/или ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), для терапевтического (и, согласно более широкому объекту изобретения, профилактического) лечения связанного(ых) с Hedgehog нарушения(ий), таких как различные типы рака.

В целом, соединения, которые применяют в способах и комбинациях, предлагаемых в изобретении, следует вводить в терапевтически эффективных количествах с помощью любого из общепринятых и приемлемых путей введения, известных в данной области, либо индивидуально, либо в сочетании с одним или несколькими терапевтическими средствами. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в широких пределах в зависимости от серьезности заболевания, возраста и относительного состояния здоровья индивидуума, эффективности применяемого соединения и других факторов. В целом, установлено, что удовлетворительные результаты можно получать при системном применении суточных доз, составляющих примерно от 0,03 до 2,5 мг/кг веса тела. Суточные дозы, показанные для более крупного млекопитающего, например человека, составляют от примерно 1000, предпочтительно 500 мг, более предпочтительно 100 мг, которые удобно вводить, например, в виде разделенных доз вплоть до 4 раз в день или в форме с пролонгированным действием (в виде ретард-формы). Приемлемые стандартные лекарственные формы для орального введения содержат примерно 1-50 мг действующего вещества.

Соединения, которые применяют в способах и комбинациях, предлагаемых в

изобретении, можно вводить в виде фармацевтических композиций с помощью любого общепринятого пути, прежде всего энтерально, например, орально, например, в форме таблеток или капсул, или парентерально, например, в форме инъеклируемых растворов или суспензий, местно, например, в форме лосьонов, гелей, мазей или кремов, или
5 назально, или в форме суппозитория. Фармацевтические композиции, которые содержат соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли в сочетании по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, можно приготавливать с помощью общепринятых методов смешения, грануляции или нанесения покрытия.
10 Например, оральные композиции могут иметь форму таблеток или желатиновых капсул, содержащих действующее вещество в сочетании с а) разбавителями, например лактозой, декстрозой, сахарозой, маннитом, сорбитом, целлюлозой и/или глицином; б) замасливателями, например диоксидом кремния, тальком, стеариновой кислотой, ее магниевой или кальциевой солью и/или полиэтиленгликолем; для таблеток также в
15 сочетании с в) связующими веществами, например алюмосиликатом магния, крахмальной пастой, желатином, трагакантом, метилцеллюлозой, натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы или поливинилпирролидоном; при необходимости с г) разрыхлителями, например крахмалами, агаром, альгиновой кислотой или ее натриевой солью, или шипучими смесями; и/или д) абсорбентами, красителями, корригентами и
20 подслащивающими веществами. Инъеклируемые композиции могут представлять собой водные изотонические растворы или суспензии, а суппозитории можно приготавливать из жирных эмульсий или суспензий.

Композиции можно стерилизовать и/или включать в их состав адъюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие или эмульгирующие агенты, вещества,
25 ускоряющие растворение, соли для регулирования осмотического давления и/или буферы. Кроме того, они могут содержать также другие ценные с позиций терапевтического действия субстанции. Приемлемые препаративные формы для трансдермального применения включают в эффективном количестве соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, и носитель. Носитель может включать
30 абсорбируемые фармакологически приемлемые растворители, способствующие прохождению через кожу хозяина. Например, трансдермальные устройства имеют форму повязки, содержащей компонент, представляющий собой подложку, резервуар, содержащий соединение, необязательно в сочетании с носителями, необязательно контролирующей скорость барьер, предназначенный для введения соединения в кожу
35 хозяина с контролируемой и предварительно определенной скоростью в течение пролонгированного периода времени, и средства для прикрепления устройства к коже. Можно использовать также препаративные формы в виде матричных трансдермальных систем. Приемлемые композиции для местного применения, например, на кожу и глаза, предпочтительно представляют собой водные растворы, мази, кремы или гели, хорошо
40 известные в данной области. Они могут содержать солубилизаторы, стабилизаторы, регулирующие тоничность агенты, буферы и консерванты.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью следующих не ограничивающих объем изобретения репрезентативных примеров, которые даны с
45 целью иллюстрации и не направлены на ограничение объема изобретения. Если не указано иное, то в примерах применяют следующие материалы и методы.

Описание моделей с использованием подкожного аллотрансплантата медуллобластомы

Клетки мышинной медуллобластомы ($1,0-5,0 \times 10^6$), полученные непосредственно путем разъединения фрагментов опухоли, выделенных перед этим из спонтанно образовавшихся медуллобластом у мышей линии Ptch+/-p53-/-, Ptch+/-Nrc+/- или Ptch+/-, подкожно инокулировали в правый бок мышей линии Harlan nu/nu. Обработку начинали примерно через 7-10 дней после имплантации. Животных разделяли случайным образом на группы обработки, они имели сходные средние объемы опухолей, составлявшие примерно 250-300 мм³. Для анализа во всех группах регистрировали два или три раза в неделю объемы опухолей (в мм³) и вес тела (в г). Дозу регулировали исходя из веса тела к моменту введения дозы. Сравнения между группами обработки осуществляли с использованием непараметрического критерия суммы рангов Крускала-Уоллиса/Вилкоксона.

Анализ данных, полученных на модели с использованием аллотрансплантата

С помощью кронциркуля определяли размеры опухолей в двух направлениях и рассчитывали объемы с помощью формулы: (длина×ширина)/2, в которой длина представляет собой наибольший измеренный размер, а ширина - более короткий размер. Величины (в процентах) размеров опухолей (группа обработки/контрольная группа, % T/C) рассчитывали с помощью следующей формулы: % T/C=100×ΔTf-i/ΔCf-i, если ΔTf-i>0, % T/T0=100×ΔTf-i/T0, если ΔTf-i<0 (регресс). Считали, что животное является частичным респондером (PR), если к концу опыта объем опухоли у него составлял менее 50% от исходного объема опухоли. Животное, у которого в конце опыта не обнаруживали пальпируемой опухоли, считали полным респондером (CR).

Пример 1: Устойчивость к лекарственным средств, выявленная на моделях с использованием мышей линии Ptch+/-

У мышей линии Ptch+/- происходит спонтанное образование медуллобластомы (Romer и др., 2004). Для тестирования соединений, которые обладают способностью ингибировать путь Hh, в качестве модели использовали опухоли, для которых ранее было установлено, что они являются Smo-зависимыми. Утрата p53 приводит к раннему началу развития и повышает частоту встречаемости медуллобластом, при этом медуллобластома развивается у 95% мышей линии Ptch+/-p53-/- и большинство из них погибает от опухолей головного мозга в течение 12 недель после рождения (Wetmore, Eberhart и Curran, 2001; Romer и др., 2004). У мышей линии Ptch+/-Nrc+/- также происходит образование медуллобластом с повышенной пенетрантностью и пониженной латентностью (Briggs и др., 2008). Было установлено, что ингибиторы Smo эффективно снижают частоту встречаемости медуллобластом у мышей линии Ptch+/-p53-/-, это было продемонстрировано как на трансгенных моделях (Romer и др., 2004), так и на моделях с использованием аллотрансплантатов, полученных из опухолей, представляющих собой медуллобластомы линии Ptch+/-p53-/- (Berman и др., 2002).

Поэтому эффективность *in vivo* Соединения 1 оценивали на моделях с использованием аллотрансплантатов мышинных медуллобластом линий Ptch+/-p53-/-, Ptch+/-Nrc+/- и Ptch+/-, которые получали из соответствующих трансгенных мышей и пассировали *in vivo*, согласно следующей схеме продолжительного непрерывного введения доз.

Пример 1a: Обработка в случае модели с использованием аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-p53+/-

Обработку в случае модели на основе линии Ptch+/-p53+/- осуществляли следующим образом:

Обработки начинали в день 8 после имплантации (5 миллионов клеток/животное). Соединение 1 вводили р.о. (т.е. орально) в дозах 5 мг/кг bid (т.е. дважды в день), 10 мг/

кг bid, 20 мг/кг qd (т.е. один раз в день), 20 мг/кг bid, 40 мг/кг bid и 80 мг/кг bid в общей сложности в течение 25 дней. Соединение 2 вводили в дозе 100 мг/кг bid в течение 25 дней. Используемый в опытах с Соединением 1 в качестве контроля наполнитель представлял собой раствор, содержащий 0,5% метилцеллюлозы и 0,5% Tween 80 в воде.

5 Исходное количество животных в каждой группе составляло 8. Группу, которую обрабатывали наполнителем, ликвидировали через 10 дней после начала обработки (массы опухолей превышали 10% от массы тела мышей). Животным вводили дозы непрерывно в общей сложности в течение 26 дневного периода обработки.

Было обнаружено, что при непрерывном введении доз в течение 26 дней (фиг.1) имел место регресс опухолей в течение первой половины периода введения доз. Однако после этого наблюдалось возобновление роста опухолей, несмотря на продолжение введения доз. Аналогично этому при введении Соединения 2 в дозе 100 мг/кг bid сначала также имел место регресс, после чего происходило возобновление роста опухолей. По окончании периода введения доз проводили анализ экспрессии мРНК Gli1 в возобновивших рост опухолях, и было установлено лишь частичное ее подавление (от 60 до 80% по сравнению с контролем, который обрабатывали наполнителем). В проведенных ранее при создании изобретения исследованиях было установлено, что для достижения регресса опухолей необходимо практически 100%-ное ингибирование мРНК Gli1. Это позволяет предположить, что возобновление роста опухолей обусловлено недостаточной степенью ингибирования пути Hedgehog, которую оценивали, используя в качестве фармакодинамического маркера мРНК Gli1.

Пример 1б: Обработка при использовании в качестве модели аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-Nis+/-

В последующем опыте, который проводили с использованием модели на основе линии Ptch+/-Nis+/- и результаты которого представлены на фиг.2, обработку проводили следующим образом:

Обработки начинали в день 7 после имплантации (5 миллионов клеток/животное). Соединение 1 вводили р.о. в дозах 5 мг/кг bid, 10 мг/кг bid, 20 мг/кг qd, 20 мг/кг bid, 40 мг/кг bid и 80 мг/кг bid в течение периода исследования. Соединение 2 вводили в дозе 100 мг/кг bid в течение периода исследования. Используемый в опытах с Соединением 1 в качестве контроля наполнитель представлял собой раствор, содержащий 0,5% метилцеллюлозы в 0,5% Tween 80 в воде. Исходное количество животных в каждой группе составляло 8. Группу, которую обрабатывали наполнителем, ликвидировали через 10 дней после начала обработки (массы опухолей превышали 10% от массы тела мышей).

В опытах с использованием модели на основе линии Ptch+/-Nis+/- в некоторых, но не во всех случаях, после начального регресса было выявлено возобновление роста опухолей. Однако у определенной подгруппы животных (см. таблицу 1) был обнаружен полный регресс. Продолжительные полные ответы наблюдались более часто при использовании более высоких доз. Это позволяет предположить, что имело место различие степени устойчивости, развившейся на моделях с использованием различных подкожных аллотрансплантатов мышечных опухолей, которые несли мутацию Ptch+/-, но характеризовались различными мутациями супрессора опухоли (p53-/- или Nis+/-).

45 Как указано на фиг.2 и в таблице 1, все опухоли линии Ptch+/-Nis+/- обрабатывали Соединением 1 в дозах, составлявших 5, 10, 20, 40 и 80 мг/кг bid и 20 мг/кг qd, и Соединением 2 в дозе 100 мг/кг bid po, начиная с дня 7 после имплантации. Представленные в таблице 1 данные, характеризующие продолжительный регресс,

представляют собой количество полных ответов, которые еще присутствовали в конце опыта в день 47.

На фиг.2, закрашенными квадратами обозначены данные, полученные при обработке только наполнителем, po bid (т.е. орально, дважды в день). Пунктирными линиями с закрашенными треугольниками обозначены результаты, полученные при обработке Соединением 2, которое вводили в дозе 100 мг/кг po bid. Пунктирными линиями с перевернутыми треугольниками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 5 мг/кг po bid. Пунктирными линиями с закрашенными ромбами обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 10 мг/кг po bid. Пунктирными линиями с закрашенными кружками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 20 мг/кг po qd. Пунктирными линиями с незакрашенными квадратами обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 20 мг/кг po bid. Пунктирными линиями с незакрашенными треугольниками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 40 мг/кг po bid. Пунктирными линиями с незакрашенными перевернутыми треугольниками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 80 мг/кг po bid.

20

Таблица 1	
Регресс, выявленный на модели медуллобластомы линии Ptch+/-Nrc+/-	
Группы	Ptch+/-Nrc+/-
Наполнитель	0/8
Соединение 1 5 мг/кг bid	0/8
Соединение 1 10 мг/кг bid	1/8
Соединение 1 20 мг/кг bid	7/8
Соединение 1 20 мг/кг qd	0/8
Соединение 1 40 мг/кг bid	3/8
Соединение 1 80 мг/кг bid	6/8
Соединение 2 100 мг/кг bid	0/8

25

30

35

40

В последующих опытах на модели на основе линии Ptch+/-Nrc+/- оценивали с использованием непрерывного введения доз два дополнительных ингибитора Smo, а именно, Соединение 3 и Соединение 4. Оба соединения сначала индуцировали регресс опухолей, после чего наблюдалось возобновление роста опухолей в присутствии соединения. Для Соединения 3 были зарегистрированы следующие количества случаев продолжительного полного регресса: 0/8 при введении дозы 40 мг/кг qd, 3/8 при введении дозы 40 мг/кг bid, 0/8 при введении дозы 60 мг/кг qd, 0/8 при введении дозы 80 мг/кг qd, 3/8 при введении дозы 100 мг/кг qd (мышам вводили дозы, начиная с дня 10 после имплантации и до дня 56, наличие продолжительного регресса фиксировали в день 56). Для Соединения 4 не было выявлено случаев продолжительного регресса (мышам вводили дозы, начиная со дня 8 после имплантации и до дня 43).

Пример 1в: Обработка при использовании в качестве модели аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-

При проведении этих опытов обработку проводили согласно описанной ниже процедуре, результаты опытов представлены на фиг.3:

45

Обработки начинали в день 7 после имплантации (5 миллионов клеток/животное). Соединение 1 вводили р.о. в дозах 10 мг/кг qd, 20 мг/кг qd, 40 мг/кг qd, 80 мг/кг qd и 160 мг/кг q в течение периода исследования. Соединение 2 вводили в дозе 100 мг/кг bid в течение периода исследования. Используемый в опытах с Соединением 1 в качестве контроля наполнитель представлял собой раствор, содержащий 0,5% метилцеллюлозы

в 0,5% Tween 80 в воде. Исходное количество животных в каждой группе составляло 8. Группу, которую обрабатывали наполнителем, ликвидировали через 7 дней после начала обработки (массы опухолей превышали 10% от массы тела мышей). Была выявлена устойчивость, аналогичная той, которая была обнаружена в случае модели на основе линии Ptc+/-Nis+/-, при этом в определенной подгруппе имелись полные респондеры, характеризующиеся уменьшением роста опухолей, а остальные особи характеризовались полным регрессом (таблица 2). Данные о 5 продолжительном регрессе, приведенные в таблице 2, представляют собой количества случаев полного регресса, еще присутствовавшего в конце опыта в день 48.

Таблица 2	
Количества случаев продолжительного регресса при использовании модели на основе линии Ptc+/-	
Группы	Ptc+/-
Наполнитель	0/8
Соединение 1 10 мг/кг qd	0/8
Соединение 1 20 мг/кг qd	1/8
Соединение 1 40 мг/кг qd	1/8
Соединение 1 80 мг/кг qd	4/8
Соединение 1 160 мг/кг qd	5/8
Соединение 2 100 мг/кг bid	0/8

На фиг.3, закрашенными квадратами обозначены данные, полученные при обработке только наполнителем, po qd (т.е. орально, один раз в день). Пунктирными линиями с закрашенными треугольниками обозначены результаты, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 10 мг/кг po qd. Пунктирными линиями с перевернутыми треугольниками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 20 мг/кг po qd. Пунктирными линиями с закрашенными ромбами обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 40 мг/кг po qd. Сплошными линиями с закрашенными кружками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 40 мг/кг po bid. Пунктирными линиями с незакрашенными квадратами обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 80 мг/кг po qd. Пунктирными линиями с незакрашенными треугольниками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 1, которое вводили в дозе 160 мг/кг po qd. Пунктирными линиями с незакрашенными перевернутыми треугольниками обозначены данные, полученные при обработке Соединением 2, которое вводили в дозе 200 мг/кг po bid.

Пример 2: Характеризация механизма устойчивости к лекарственным средствам

Для характеристики изменений генной экспрессии в чувствительных опухолях по сравнению с устойчивыми опухолями (определение обоих понятий приведено в настоящем описании) выделяли РНК из чувствительных опухолей, обработанных наполнителем или Соединением 1 в течение 4 ч (однократная доза), 16 ч (однократная доза) и 48 ч (три дозы), а также из устойчивых опухолей (у которых сначала наблюдался регресс в присутствии Соединения 1 (день 13), но затем было выявлено возобновление роста в присутствии лекарственного средства, как это описано выше). Для каждой группы обработки анализировали по три опухоли: группа чувствительных опухолей включала опухоли, которые обрабатывали Соединением 1 в дозе 20 мг/кг в течение 4, 16 и 48 ч. Группа устойчивых опухолей включала опухоли, которые обрабатывали Соединением 1 в дозах 10 мг/кг bid и 80 мг/кг bid в течение 26 дней.

Экспрессию мРНК в образцах опухолей анализировали методом профилирования фирмы Affymetrix. Полученные данные об экспрессии анализировали с использованием

программы анализа пути фирмы GeneGo, которая позволяет осуществлять группировку данных в соответствии с путями трансдукции сигналов. Было установлено, что гены, активность которых играет роль в пути передачи сигналов Hedgehog, подавлялись в чувствительных опухолях в зависимости от времени при обработке Соединением 1 в течение 4, 16 и 48 ч. В устойчивых опухолях (для которых сначала наблюдался регресс в присутствии Соединения 1 (день 13), но у которых затем было выявлено возобновление роста в присутствии лекарственного средства) уровень экспрессии генов пути Hedgehog был близок к уровню экспрессии в опухолях, которые обрабатывали наполнителем, это свидетельствует о том, что Соединение 1 более не обеспечивало достаточную степень ингибирования экспрессии генов пути Hedgehog. Сходная схема экспрессии была выявлена для генов пути биосинтеза холестерина. Другая схема экспрессии была выявлена для генов, активность которых играет роль в пути PI3K. В этом случае не было выявлено изменений уровня генной экспрессии в чувствительных опухолях после обработки Соединением 1 в течение 4, 16 и 48 ч. Однако в устойчивых опухолях была выявлена повышающая регуляция активности пути PI3K по сравнению с чувствительными опухолями.

Пример 2а: Характеризация механизма реактивации пути Hedgehog

Одним из предполагаемых механизмов этого действия являются генетические изменения в устойчивых опухолях, которые приводят к реактивации пути Hedgehog, несмотря на присутствие ингибиторов Smo. Их примерами могут служить мутации Smo, оказывающие влияние на связывание ингибиторов, и/или мутации в низлежащих по отношению к Smo генах, которые приводят к реактивации пути Hedgehog (например, в таких генах, как Sufu, Gli1, Gli2).

Из устойчивых опухолей и из чувствительных опухолей выделяли ДНК и осуществляли секвенирование. В Sufu, Smo, Gli1 и Gli2 не было выявлено мутаций, специфических для устойчивых опухолей по сравнению с чувствительными.

Выделяли также ДНК из 3 чувствительных и 3 устойчивых опухолей линии Ptch+/-p53-/- и анализировали в отношении затрагивающей весь геном амплификации или делеций с использованием набора олигонуклеотидов Agilent CGH Analytics 3.2. Для сравнения использовали ДНК из печени мышей линии Ptch+/-p53-/-. Как продемонстрировано на фиг.4, амплификация Gli2 была выявлена в 2 из 3 устойчивых опухолях и не была обнаружена ни в одной из чувствительных опухолей.

Для анализа количества копий Gli2 во всех устойчивых опухолях был разработан метод количественной ПЦР для Gli2 (а также для Gli1 и Gli3). Амплификация Gli2 была выявлена в большом количестве (процентном) устойчивых опухолей при использовании модели на основе линии Ptch+/-p53-/- (в 24 из 44 устойчивых опухолей), но в меньшем количестве при использовании модели на основе линии Ptch+/- (10%). Амплификация Gli2 не была выявлена при использовании модели на основе линии Ptch+/-Nrc+/-.

Полученные данные позволяют предположить, что амплификация низлежащего фактора транскрипции Gli2 может быть ответственна за реактивацию пути Hedgehog в присутствии ингибиторов smo в некоторых устойчивых опухолях. Ингибиторы, которые оказывают воздействие на Gli1 или Gli2, могут обладать способностью ингибировать рост устойчивых опухолей.

Пример 2б: Характеризация механизма ингибирования пути биосинтеза холестерина

Повышающая регуляция пути биосинтеза холестерина может оказывать влияние на реактивацию пути Hedgehog в устойчивых опухолях. Ранее было установлено, что оксистеринны функционируют в качестве медиаторов передачи сигналов в пути Hedgehog (Corcoran и др., PNAS 103(22), 2006, с.8408). Повышенные уровни оксистерина в клетке

могут оказывать влияние на ингибирование активности Smo ингибиторами Smo либо непосредственно в результате конкуренции за сайты связывания на Smo, либо косвенно, оказывая воздействие на связывание ингибитора. Ингибирование пути биосинтеза холестерина статинами может приводить к ингибированию роста устойчивых опухолей или может предупреждать развитие устойчивости как при их действии индивидуально, так и в комбинации с ингибиторами Smoothend.

Воздействие статинов (например, симвастатина, флустатина) на пролиферацию клеток медуллобластомы, выделенных из чувствительных и устойчивых опухолей линии Ptch+/-, оценивали с помощью «анализа пролиферации медуллобластомы ex vivo». При создании изобретения был разработан 48-часовой экспресс-анализ пролиферации, основанный на использовании опухолей медуллобластомы линии Ptch+/--p53-/-, Ptch+/--Hic+/--или Ptch+/- сразу после их выделения, который позволяет оценивать in vitro эффективность ингибиторов Smo. Оценку пролиферации проводили на основе данных о включении 3H-тимидина. Анализ позволял оценивать in vivo чувствительность опухолевых клеток к Соединению 1. Ингибирование чувствительных опухолевых клеток Соединением 1 характеризовалось величиной IC₅₀, составлявшей 4нМ, в то время как для устойчивых опухолей величина IC₅₀ составляла более 20 мкМ.

Как продемонстрировано в таблице 3, ингибитор пути биосинтеза холестерина симвастатин вызывал ингибирование как чувствительных, так и устойчивых опухолевых клеток, при этом величины IC₅₀ находились в низком наномолярном диапазоне. Это позволяет предположить, что статины могут обладать способностью ингибировать рост устойчивых опухолей медуллобластомы in vivo или что комбинация, включающая ингибиторы Smo и статины, может обладать способностью предупреждать развитие устойчивости.

Тип опухоли	Соединение 1, IC ₅₀ (мкМ)	Соединение А, IC ₅₀ (мкМ)	Симвастатин, IC ₅₀ (мкМ)
Чувствительная опухоль	0,003	0,2	0,004
Устойчивая опухоль	>20	0,22	0,004

Пример 2в: Введение ингибиторов пути PI3K

Для оценки роли пути киназы PI3 в развитии медуллобластомы использовали Соединение А, представляющее собой ингибитор киназы PI3. В таблице 4 обобщены результаты лечения медуллобластом с использованием Соединения 1 (Соединение формулы II, представляющее собой ингибитор Smoothened), Соединения А (Соединение формулы А, представляющее собой ингибитор PI3K) и их комбинации. Соединение А обладает способностью ингибировать липидкиназную активность PI3K. Известно, что помимо прочих воздействий Соединение А обладает способностью ингибировать фосфорилирование и активацию низлежащего эффектора Akt и S6 как в чувствительных, так и в устойчивых клетках (см. фиг.5).

Эксперимент	Генотип	Тип опухоли	Соединение 1 (мкМ)	Соединение А (мкМ)	Соединение1+А мкМ)
120707	ptch+/--Hic+/-	Чувствительная	0,004	0,3	н.о.
120707	ptch+/--Hic+/-	Устойчивая	>20	0,15	н.о.
021908	ptch+/--Hic+/-	Чувствительная	0,002	0,11	н.о.
020508	ptch+/--Hic+/-	Устойчивая	>20	0,3	н.о.
031708	ptch+/--Hic+/-	Устойчивая	>20	0,17	0,17 (5 мкМ 225) 0,001 (20 мкМ 225)

* ингибитор Р1ЗК класса I (альфа, бета и дельта)

Воздействие ингибиторов Р1ЗК (например, таких соединений, как Соединение А) на пролиферацию клеток медуллобластомы, полученных из чувствительных и устойчивых опухолей медуллобластомы, оценивали с помощью описанного выше «анализа пролиферации медуллобластомы *ex vivo*). Как продемонстрировано в Таблице 4, Соединение 1 ингибировало чувствительные клетки, при этом величина IC_{50} составляла от 2 до 4 нМ, в то время как для устойчивых опухолей величина IC_{50} превышала 20 мкМ. Однако Соединение А, представляющее собой ингибитор киназы Р1З, ингибировало как чувствительные, так и устойчивые опухоли, при этом величины IC_{50} были близкими.

Как продемонстрировано на фиг.5, Соединение А ингибировало фосфорилирование Akt и S6 как в чувствительных, так и в устойчивых опухолях, при его применении в близких концентрациях. Это свидетельствует о наличии корреляции между ингибированием пути киназы Р1З и ингибированием пролиферации.

Затем было проведено изучение комбинации, включающей Соединение 1 и Соединение А, на модели с использованием аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-Nrc+/- . Как указано на фиг.6А, животным вводили Соединение 1 в дозе 40 мг/кг qd, Соединение А в дозе 60 мг/кг qd и комбинацию, включающую Соединение 1 и Соединение А. В то время как Соединение А оказывало лишь небольшое воздействие на рост опухоли по сравнению с применяемым в качестве контроля наполнителем, Соединение 1 сначала индуцировало регресс, однако затем начиналось возобновление роста опухолей. У животных, которых обрабатывали комбинацией, включающей Соединение 1 и Соединение А, не было выявлено возобновления роста опухолей.

Комбинированная обработка приводила к удлинению времени до достижения конечной точки (объема опухоли >1500 мм), соответствующие данные представлены на фиг.6Б. Животных, которых обрабатывали применяемым в качестве контроля наполнителем и Соединением А, приходилось умерщвлять примерно в день 20 и день 25 соответственно, поскольку у них объемы опухолей достигали 1500 мм. У животных, которых обрабатывали Соединением 1, период времени до достижения конечной точки был существенно более длинным. В группе, которую обрабатывали комбинацией, большинство мышей оставались живыми на протяжении всего опыта. Сходные результаты были получены на животных, которых обрабатывали только одним Соединением 1 в течение первых 10 дней, после чего продолжали обработку только одним агентом, представляющим собой Соединение А (данные не приведены). Полученные результаты демонстрируют, что использование комбинации, включающей ингибиторы Smo и ингибиторы Р1ЗК, позволяет существенно замедлять или предупреждать развитие устойчивости в случае рассмотренной модели медуллобластомы.

Далее, было проведено изучение комбинации, включающей Соединение 1 и Соединение В, на модели с использованием аллотрансплантата медуллобластомы линии Ptch+/-Nrc+/- . Как указано на фиг.7А, животным вводили Соединение 1 в дозе 80 мг/кг qd, Соединение В в дозе 40 мг/кг qd и комбинацию, включающую Соединение 1 и Соединение В. В то время как Соединение В оказывало лишь небольшое воздействие на рост опухоли по сравнению с применяемым в качестве контроля наполнителем, Соединение 1 сначала индуцировало регресс, однако затем начиналось возобновление роста опухолей. У животных, которых обрабатывали комбинацией, включающей Соединение 1 и Соединение В, возобновление роста опухолей существенно замедлялось.

Обработка комбинацией приводила к удлинению времени до достижения конечной точки (объема опухоли >700 мм), соответствующие данные представлены на фиг.7Б. Животные, которых обрабатывали применяемым в качестве контроля наполнителем и Соединением В, достигали конечной точки примерно в день 12 и день 15
 5 соответственно, поскольку у них объемы опухолей достигали 700 мм. У животных, которых обрабатывали Соединением 1, период времени до достижения конечной точки был существенно более длинным. В группе, которую обрабатывали комбинацией, большинство мышей оставались живыми на протяжении всего опыта. Полученные
 10 результаты демонстрируют, что использование комбинации, включающей ингибиторы Smo и ингибиторы PI3K, позволяет существенно замедлять или предупреждать развитие устойчивости в случае рассмотренной модели медуллобластомы.

Формула изобретения

1. Комбинация для лечения связанного с Hedgehog рака, которая включает ингибитор
 15 Smoothened и ингибитор киназы PI3K, где ингибитор Smoothened представляет собой [6-(цис-2,6-диметилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид2-метил-4'-
 трифторметоксибифенил-3-карбоновой кислоты, N-[4-хлор-3-(5-диметиламино-1Н-бензимидазол-2-ил)фенил]-3,5-диметоксибензамид, 2-[(R)-4-(6-бензил-4,5-
 20 диметилпиридазин-3-ил)-2-метил-3,4,5,6-тетрагидро-2Н-[1,2']бипиразинил-5'-ил]пропан-
 2-ол или их фармацевтически приемлемые соли, и ингибитор киназы PI3K выбирают из группы, включающей 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хинолин-3-ил-2,3-
 25 ди гидроимидазо[4,5-с]хинолин-1-ил)фенил]пропионитрил, 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-
 3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметилфенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-
 2-он, 5-(2,6-диморфолин-4-ил-пиримидин-4-ил)-4-трифторметилпиридин-2-иламин или
 их фармацевтически приемлемые соли.

2. Комбинация по п.1, где рак представляет собой медуллобластому.

3. Комбинация по п.1, где рак представляет собой устойчивую опухоль.

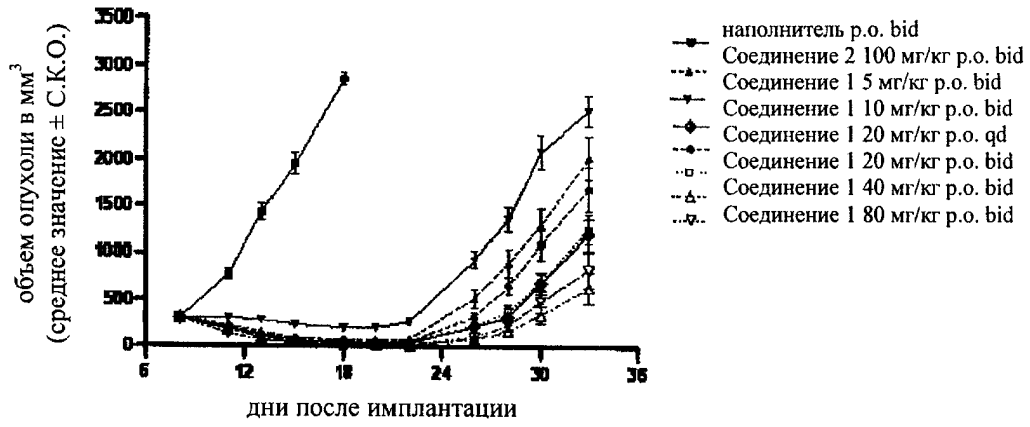
4. Комбинация для лечения связанного с Hedgehog рака, которая включает ингибитор
 Smoothened и ингибитор Gli, где ингибитор Smoothened представляет собой [6-(цис-2,6-
 30 диметилморфолин-4-ил)пиридин-3-ил]амид2-метил-4'-трифторметоксибифенил-3-
 карбоновой кислоты, N-[4-хлор-3-(5-диметиламино-1Н-бензимидазол-2-ил)фенил]-3,5-
 диметоксибензамид, 2-[(R)-4-(6-бензил-4,5-диметилпиридазин-3-ил)-2-метил-3,4,5,6-
 тетрагидро-2Н-[1,2']бипиразинил-5'-ил]пропан-2-ол или их фармацевтически приемлемые
 соли, и ингибитор Gli выбирают из группы, включающей зерумбон, эпоксид зерумбона,
 35 стауроспоринон, 6-гидроксистауроспоринон, арцириафлавин С, 5,6-
 дигидроксиарцириафлавин А, физалин F, физалин В, GANT61 и GANT58.

5. Комбинация по п.4, где рак представляет собой медуллобластому.

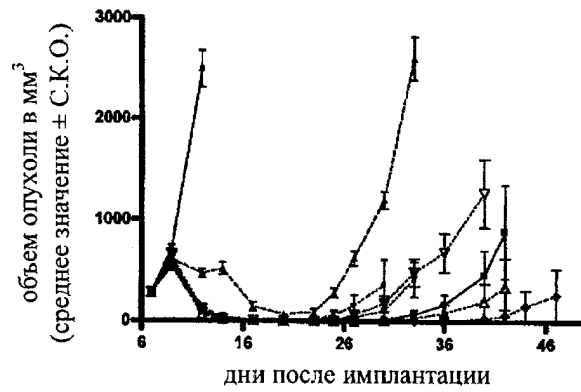
6. Комбинация по п.4, где рак представляет собой устойчивую опухоль.

40

45

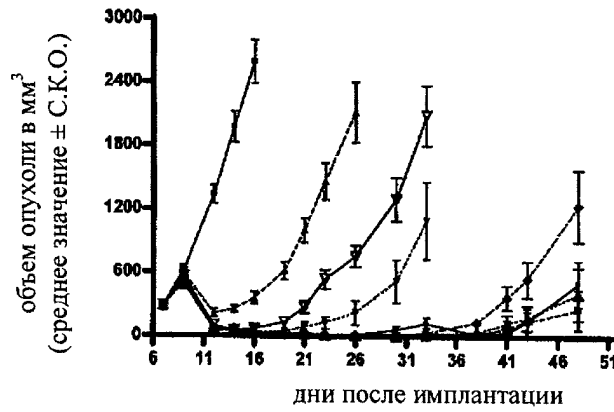


Фиг. 1

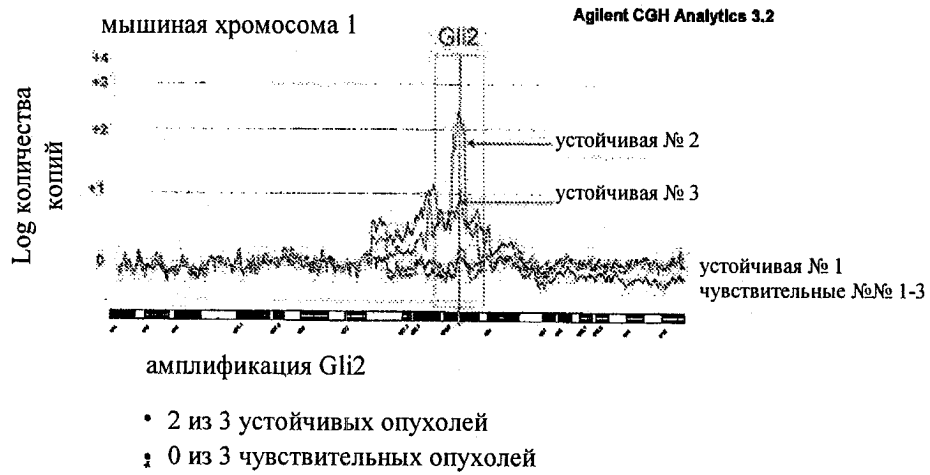


Фиг. 2

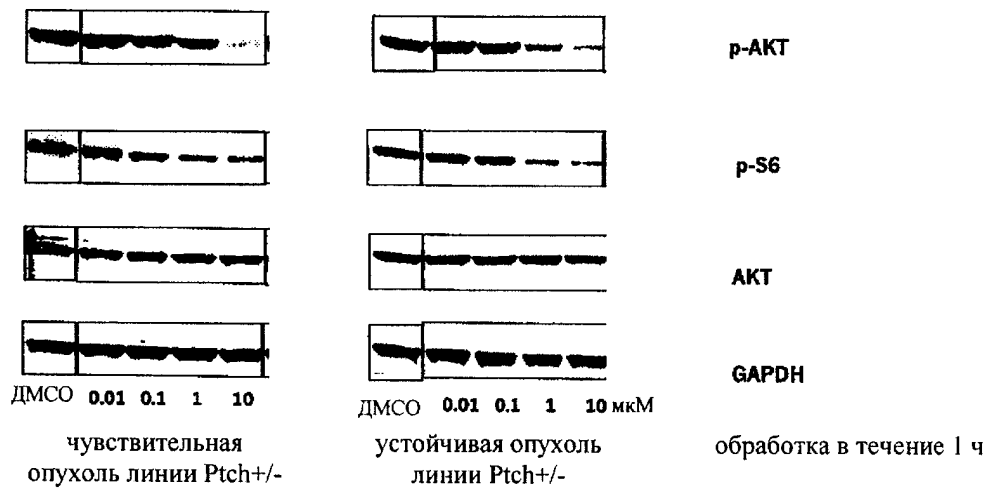
Возобновление роста опухолей линии
РТС+/-



Фиг. 3

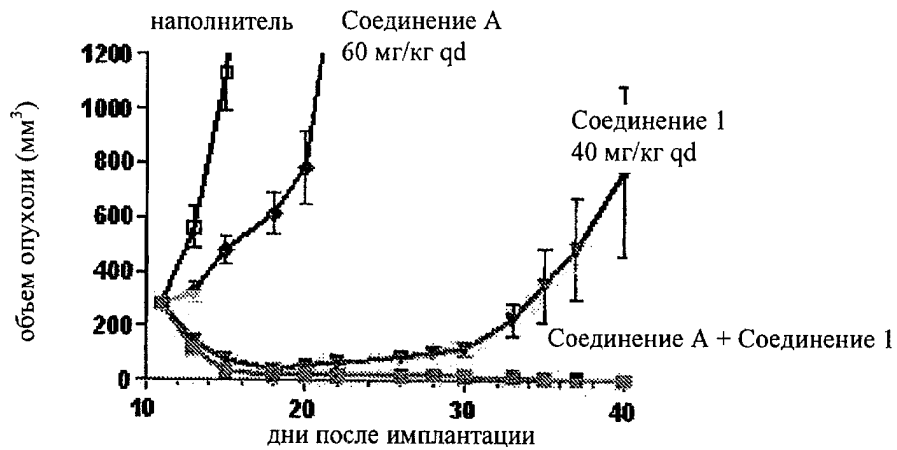


Фиг. 4



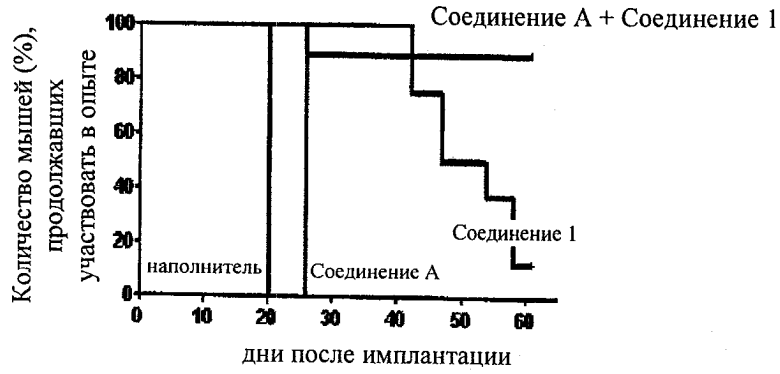
Фиг. 5

Рост опухолей



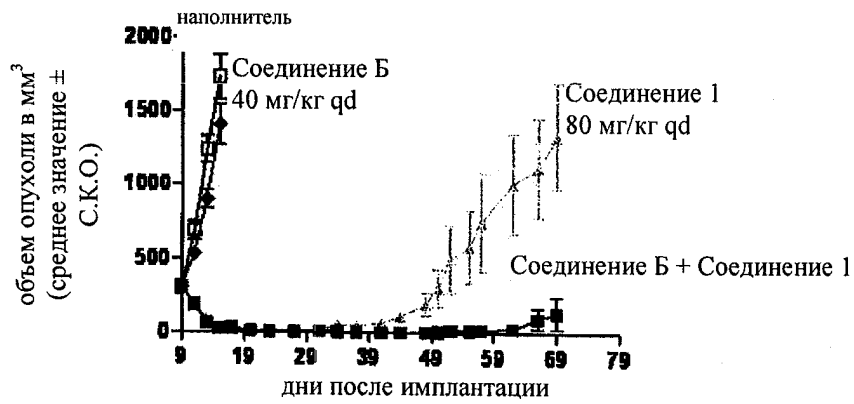
Фиг. 6А

Период времени до прогрессирования
заболевания (объем опухоли >1500 мм³)



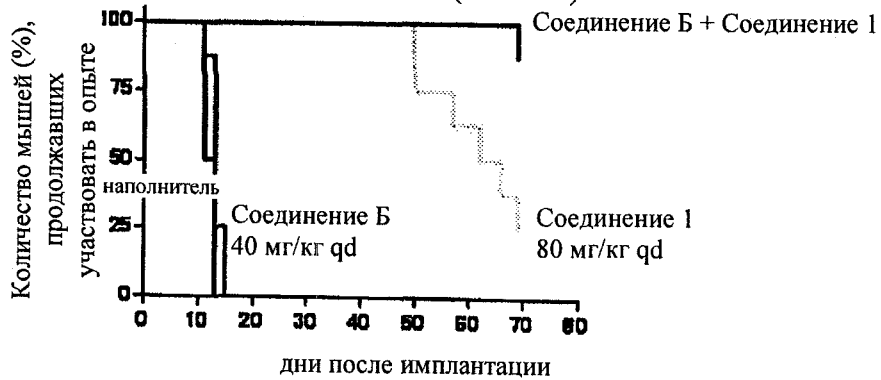
Фиг. 6Б

Средний объем опухоли



Фиг. 7А

Период времени до прогрессирования
заболевания (700 мм³)



Фиг. 7Б