



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 066 327 B1**

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(51) Int. Cl.
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(10) Registreeringu number:	E007527	(73) Patendiomanik:	Janssen Pharmaceutica NV Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
(11) Patendikirjelduse tõlke number:	EE-EP 2 066 327	(72) Leiutise autorid:	ARTS, Janine Janssen Pharmaceutica NV, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
(30) Prioriteediandmed:	15.09.2006 EP 06120726		HELLEMANS, Peter Willem Jan Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
	03.05.2007 US 915895 P		JANICOT, Michel Marie François Janssen Pharmaceutica NV, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:	11.09.2007		PAGE, Martin John Janssen Pharmaceutica NV, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
(96) Euroopa patendi-taotluse number:	07803397.4		
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev:	14.11.2012	(74) Patendivolinik:	Enn Urgas Patendibüroo Turvaja OÜ Liivalaia 22, 10118 Tallinn, EE
(97) Euroopa patendi number:	EP 2 066 327		
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:	28.01.2013		
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:	15.04.2013		

(54) Klass I ja klass IIb histooni deatsetülaaside suhtes kombineeritud aktiivsusega histooni deatsetülaasi inhibiitorid kombinatsioonis proteasoomi inhibiitoritega

**KLASS I JA KLASS IIB HISTOONI DEATSETÜLAASIDE SUHTES
KOMBINEERITUD AKTIIVSUSEGA HISTOONI DEATSETÜLAASI
INHIBIITORID KOMBINATSIOONIS PROTEASOOMI INHIBIITORITEGA**

- 5 See leiutis käsitleb klass I ja klass II histooni deatsetülaaside suhtes kombineeritud aktiivsusega histooni deatsetülaasi (HDAC – *histone deacetylase*) inhibiitoreid. Käsitletakse neid sisaldavaid kombinatsioone ja kompositsioone ning samuti nende kasutamist ravimina, näiteks ravimina hematopoeetiliste tuumorite nagu lümfoomide ja leukeemiate pärssimiseks.

10

- HDAC ensüümide perekond on nime saanud oma esimesena tuvastatud substraadi, s.o tuuma histoonvalkude järgi. Histoonvalgud (H2A, H2B, H3 ja H4) moodustavad oktameerse kompleksi, mille ümber DNA heeliksi keerdumisel saadakse kondenseerunud kromatiinstruktuur. Histoonide atsetüülimisolek on atsetüülivate
- 15 histooni atsetüültransferaaside (HAT – *histone acetyl transferases*) ja histooni otste deatsetüülimise eest vastutavate HDAC-de poolt reguleeritud dünaamilises tasakaalus. HDAC ensüümi pärssimine võimendab nukleosoomi histoonide otste atsetüülimist, viies transkriptsioonilile vastuvõtlikuma kromatiinstruktuuri moodustumiseni, mis omakorda mõjutab rakuliste protsessidega nagu rakuproliferatsioon, apoptoos ja diferentseerumine
- 20 seotud geenide ekspressiooni. Viimastel aastatel on tuvastatud üha enam täiendavaid mittehistoonseid HDAC substraate.

- Kontrollimatut ja püsivat HDAC kogunemist koos onkogeensete transkriptsioonifaktoritega kromatiinile on leitud selliste spetsiifiliste leukeemia ja
- 25 lümfoomi vormide puhul nagu äge promüelotsüütne leukeemia (APL – *acute promyelocytic leukemia*), mitte-Hodgkini lümfoom ja äge müeloidne leukeemia (AML – *acute myeloid leukemia*). Valgu tasemel HDAC1 ülesreguleerimist on leitud eesnäärmevähi rakkudes, kui haigus areneb pahaloomulistest kolletest ja hästi diferentseerunud androgeenitundlikkust eesnäärme adenokartsinoomist fenotüübiliselt
- 30 dediferentseerunud androgeenitundetuks eesnäärmevähiks. Peale selle on HDAC2 ekspressioon suurenenud valdava osa inimese käärsoolevähi eksplantaatide puhul, mis on tekkinud tuumori supressori kao tõttu käärsoole adenomatoosse polüpoosi puhul (APC – *adenomatosis polyposis coli*).

Kooskõlas HDAC/HAT aktiivsuse tasakaaluga vähi puhul, on näidatud, et HDAC inhibiitorid indutseerivad rakutsükli peatumist, terminaalset diferentseerumist ja/või apoptoosi laia spektri inimese tuumorirakuliinide puhul *in vitro*, pärssides angiogeneesi ja avaldades *in vivo* tuumorivastast toimet inimese ksenograafi mudelites karvututel hiirtel.

HDAC ensüümide perekond jagatakse tavaliselt 3 klassi: s.o klassid I, II ja III. Siiani on kliinilistes uuringutes peamiselt leitud ainult klasside I ja II seotus HDAC inhibiitorite toimete vahendamisega.

On näidatud, et klass-I rühma HDAC-del, mis on HDAC perekonna liikmed 1-3 ja 8, on kriitiline tähtsus tuumori rakuproliferatsioonis.

Paljude erinevate transkriptsioonifaktorite hulgas, mis kasutavad klass-I HDAC-sid spetsiifiliste promootorite vaigistamiseks, on parimaks tuntud näiteks tuuma hormoonretseptorite klass, mis seob HDAC3 ainult oma ligandi puudumisel ja säilitab nii transkriptsiooniliselt vaigistatud oleku. Kompleks dissotsieerub ligandist, näiteks retinoididest, östrogeenidest, androgeenidest jne, sõltuval viisil, põhjustades geeniekspressiooni ja diferentseerumist. Veel üheks võtmenäiteks on tsükliinsõltuva kinaasi inhibiitori p21^{waf1, cipl} HDAC1-sõltuv vaigistamine. p21^{waf1, cipl} kriitilist rolli HDAC inhibiitorite antiproliferatiivsete toimete indutseerimisel näidati uuringutes, kus ilmnes 6-kordne resistentsuse suurenemine HDAC inhibiitori trihhostatiin A (TSA) suhtes p21^{waf1, cipl} puudulikes rakkudes algsete HCT-116 rakkudega võrreldes. Peale selle leidub p21^{waf1, cipl} erinevalt loomulikest tuumori supressorgeenidest rohkelt tuumorirakkudes ja teda indutseerivad HDAC inhibiitorid.

Histoonid ei ole ainsad klass-I HDAC-de substraadid. Näiteks HDAC-d 1-3 deatsetüülivad tuumori supressori p53, mis seejärel ubikvineeritakse ja lagundatakse. Kuna p53 on mõjus rakutsükli peatamises ja apoptoosos osalev tuumori supressor, on selle valgu madalate tasemete hoidmine võtmeks, mis võimaldab tuumorirakkudel ellu jääda ja kontrollimatult prolifereeruda.

Klass-II HDAC-d võib jagada 2 alamklassi: klassi-IIa kuuluvad HDAC-d 4, 5, 7, 9 ja HDAC9 splaissvariant MITR. Klassi-IIb kuuluvad HDAC6 ja HDAC10, millel mõlemal on topelt HDAC domeenid. Klass-IIa HDAC-del endil puudub histooni deatsetülaasi aktiivsus, kuid nad reguleerivad geeniekspressiooni ühendavate faktoritena toimides, kuna nad seonduvad nii klass-1 HDAC kompleksidega kui transkripsioonifaktori/DNA kompleksidega.

HDAC6, klass-IIb liige, on äratanud tähelepanu selle tõttu, et ta tuvastati kui Hsp90 deatsetülaas. On näidatud, et HDAC inhibiitorid LAQ824 ja LBH589 indutseerivad Hsp90 deatsetüülimist, samas kui trapoksiin ja naatriumbutüraat seda ei tee. Hsp90 deatsetülaas põhjustab ellujäämiseelsete ja prolifereerumiseelsete sihtrakkudega seotud Hsp90 lagundamist. Võtmenäidete hulka kuuluvad Her-2, Bcr-Abl, glükokortikoidi retseptor, mutantne FLT-3, c-Raf ja Akt. Lisaks valgule Hsp90 vahendab HDAC6 ka tubuliini deatsetüülimist, mis põhjustab mikrotuubulite destabiliseerumist stressitingimustes.

HDAC6 bioloogilist rolli kinnitab lisaks asjaolu, et spetsiifiline väikesemolekuliline HDAC6 inhibiitor tubatsiin põhjustab α -tubuliini hüperatsetüülimist ja vähendab raku motiilsust ilma rakutsükli kulgemist mõjutamata. Tubatsiin, mis pärssib ainult HDAC6 α -tubuliini deatsetülaasi domeeni, põhjustab ainult minimaalst HSP90 atsetüülimist.

Sellega kooskõlas leiti, et HDAC6 on MCF-7 rinnakartsinoomi rakkude östradiool-stimuleeritud rakkude migreerumise võtmeteguriks.

Viimasena olgu öeldud, et HDAC6 on väga oluline rakkudes valesti voltunud valkude töötlemisel ja nende tsütoplastmast eemaldamisel.

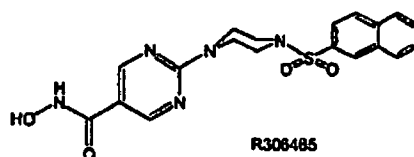
HDAC-de poolt kas ekspressiooni või aktiivsuse tasemel reguleeritavate rakutsükli regulatoorsete valkude suure hulga tõttu ei saa HDAC inhibiitorite antiproliferatiivne toime olla seotud ühe toimemehhanismiga. HDAC pärssimine on paljutõotav vähivastase ravi puhul, kui kooskõlastatud toimed mitmetele kasvu pärssimise, diferentseerumise ja apoptoosiga seotud radadele võivad anda ravieelise heterogeense patoloogia, näiteks tuumori moodustumise ja kasvu, puhul.

Aastate jooksul on selgunud, et HDAC-del ei ole võtmeroll ainult kartsinogeneesi puhul, vaid ka paljudes mittepahaloomulistes diferentseerumisprotsessides. See on kõige ilmsem klass-IIa 4, 5, 7 ja 9 puhul. Näiteks arvatakse, et HDAC7 on kriitilise tähtsusega tuumuse küpsetes T-rakkudes, samas kui HDAC4 seostatakse kondrotsüütide hüpertroofia ja endokondraalse luu moodustumise reguleerimisega. Kuid suur osa tähelepanust on keskendunud klass-IIa HDAC-de rollile lihase diferentseerumises. HDAC-d 4, 5, 7 ja 9 pärivad kõik müotsüütide (lihaskud) diferentseerumist kuna nad on müotsüüdi võimendava faktori 2 (MEF2 – *myocyte enhancer factor 2*) transkriptsiooni kaasrepressorid.

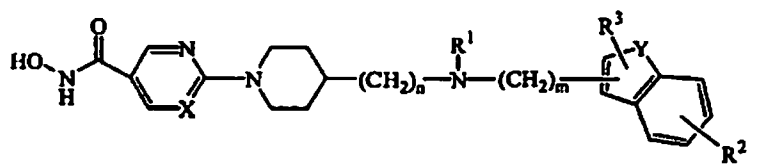
Kõige levinumaks HDAC inhibiitorite puhul leitud toksilisuseks on kergel kuni mõõdukal määral avalduv müelosupressioon. Lisaks on paljudes kliinilistes uuringutes avaldunud kõrvaltoimetena iiveldus/oksendamine, väsimus ja kõhulahtisus.

15

18. septembril 2003 avaldatud publikatsioonis EP 1485365 kirjeldatakse muuhulgas HDAC inhibiitorit R306465.



20 2. veebruaril 2006 avaldatud publikatsioonis WO 2006/010750 kirjeldatakse allolevale Markushi valemile vastavate ühendite



nende N-oksiidi vormide, farmatseutiliselt vastuvõetavate liitsoolade ja stereokeemiliselt isomeersete vormide,
 25 milles n, m, R¹, R², R³, X ja Y tähendused on mainitud leiutiskirjelduses määratletud, preparaati, valmistamist ja farmatseutilisi omadusi.

Kuid ravivõimalused HDAC inhibiitoritega on laiemad kui ühe aine kasutamine. HDAC inhibiitorite mõjutatavad molekulaarsed rajad muudavad need kombinatsioonravi uuringute paljutöötavateks kandidaatideks.

- 5 Vaja on inhibiitoreid, millel oleks kombineeritud toimed klass-I ja klass-IIb HDAC-de suhtes, millel oleks kliinilisi eeliseid tõhususe ja/või toksilisuse seisukohalt kas eraldi või koos teiste raviainetega.

Ka proteasoomi pärssimine on oluliseks hiljuti väljatöötatud vähiravi strateegiaks.

- 10 Proteasoom on mitmete ensüümide kompleks, mida leidub kõigis rakutsükli reguleerimisega seotud valkude lagundamises osalevates rakkudes. Paljud olulised regulaatorvalgud, sealhulgas p53, tsükliinid ja tsükliinsõltuv kinaas p21^{waf1/cip1}, degradeeritakse kindlal ajal rakutsükli käigus ubikvitiin-proteasoomi rajas. Nende valkude korrapärane lagundamine on vajalik selleks, et rakud läbiksid rakutsükli ja
- 15 teeksid läbi mitoosi. Lisaks on ubikvitiin-proteasoomi rada vajalik transkriptsiooni reguleerimiseks.

- Publikatsioonides EP 788360, EP 1312609, EP 1627880, US 6066730 ja US 6083903 kirjeldatakse proteasoomi inhibiitoritena kasulikke peptiidi boroonester ja -happe
- 20 ühendeid. Ühel ühendil N-pürasiinkarbonüül-L-fenüülalaniin-L-leutsiinboroonhappel (PS-341, nüüd tuntud kui bortesomiib või Velcade (Millenium)) on tuumorivastane toime inimese tuumori ksenograafi mudelites ja see on saanud heakskiidu relapseeruva refraktoorse hulgemüeloomiga patsientide raviks ning läbib praegu kliinilis uuringuid täiendavate näidustuste puhul, mille hulka kuuluvad täiendavad hematoloogilised
- 25 vähktõved ja samuti tihked tuumorid. Bortesomiib indutseerib rakusuma põhjustades valesti voltunud ja muul moel kahjustatud valkude kogumist, aktiveerides nii apoptoosi mitokondriaalse raja, näiteks Bax- või reaktiivsetest hapnikuliikidest sõltuvate mehhanismide kaudu.

- 30 Bortesomiib põhjustab ubikvitiin-konjugeeritud valkude sekvesteerimist agresoomideks nimetatud struktuuridesse. Arvatakse, et agresoomid osalevad tsütoprotektiivses vastuses, mis aktiveeritakse vastusena proteasoomi pärssimisele, tõenäoliselt viies ubikvineeritud valke lagundamiseks lüsoosoomidesse.

Bortesomiib-indutseeritud agreesoomi moodustumist saab takistada HDAC inhibiitorit suberoüülaniliidhüdroksoamhapet (SAHA – *suberoylanilide hydroxamic acid*) kasutades. SAHA avaldab ka sünergistlike toimeid apoptoosile *in vitro* ja ortotoopsele
5 pankreasevähi ksenograaftudelile *in vivo* (Cancer Research 2006; 66: (7) 3773-3781).

Veel üks HDAC inhibiitor LAQ824 põhjustab koos bortesomiibiga sünergistlikel tasemetel rakusurma (Journal of Biological Chemistry 2005; 280: (29) 26729-26734).

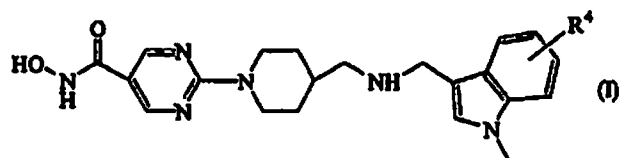
10 SAHA ja LAQ824 koos bortesomiibiga avalduvat sünergistliku toimet seostatakse nende HDAC6 pärssiva aktiivsusega.

Veel on vaja suurendada proteasoomi inhibiitorite pärssivat tõhusust tuumori kasvu suhtes ja samuti on vaja selliste ainete madalamaid doose patsiendil võimalike toksiliste
15 kõrvaltoimete vähendamiseks.

Praegu ei ole selgeid andmeid atsetüülimise ulatuse ja tuumori vastuse korrelatsiooni kohta saadaval. Kiired, lihtsad ja hõlpsalt reprodutseeritavad meetodid histoonide ja mittehistoonsete substraatide atsetüülimise ulatuse mõõtmiseks, mida põhjustavad
20 allpool kirjeldatud HDAC inhibiitorid või mainitud HDAC inhibiitoreid sisaldavad kombinatsioonid, on tulevikus hädavajalikud.

Leiutise üheks eesmärgiks on allpool kirjeldatud tüüpi HDAC inhibiitorite ning proteasoomi inhibiitori ja HDAC inhibiitorite ravitoimeliste kombinatsioonide saamine,
25 millel oleks stabiilsed ja iseloomulikud atsetüülimistoimed, mis pärsiksid nii klass-I kui klass-IIb HDAC-sid, millel oleks soodsad tuumorirakkude kasvu pärssivad toimed ja vähem soovimatuid kõrvalmõjusid.

Siin kirjeldatakse kombinatsiooni proteasoomi inhibiitorist ja valemile (I) vastavast
30 HDAC inhibiitorist



selle farmatseutiliselt vastuvõetavatest happe- või aluseliitsooladest ja stereokeemiliselt isomeersetest vormidest, milles

R^4 on valitud vesiniku või halogeeni seast.

5

Huvipakkuvateks ühenditeks on need ühendid valemiga (I), milles R^4 on fluor.

Veel huvipakkuvamateks ühenditeks on need ühendid valemiga (I), milles R^4 on indooli positsioonis 4 või 7.

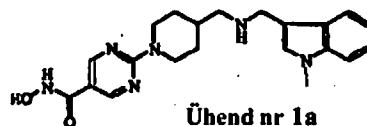
10

Eelistatud ühenditeks valemiga (I) on ühend nr 1a, ühend nr 30 ja ühend nr 39, mis vastavad WO 2006/010750 osutatud numeratsioonile.

$C_2HF_3O_2$; ühend 1a	$C_2HF_3O_2$ (1:1); ühend 30
$C_2HF_3O_2$ (1:1); ühend 39	

Teisteks eelistatud ühenditeks valemiga (I) on ühendid, milles R^4 on vesinik. Leiutise

15 kohaselt on valemile I vastavaks HDAC inhibiitoriks ühend nr 1a (JNJ26481585)



või selle farmatseutiliselt vastuvõetav liitsool ja proteasoomi inhibiitoriks on bortesomiib.

Asendajatelt bitsüklilistesse tsükliüsteemidesse tõmmatud jooned näitavad, et sidemed võivad olla kinnitunud bitsüklilise tsükliüsteemi ükskõik millisele sobivale tsükliatomile.

- 5 Vastavalt ülalkirjeldatud määratlustes ja edaspidi kasutatule on halo üldiselt fluoro, kloro, bromo ja jodo.

- Siinkasutatuna on mõisted "histooni deatsetülaas" ja "HDAC" ette nähtud osutama mistahes ensüümide perekonnale, mis eemaldavad atsetüülühmad histooni N-terminuses lüsiinijääkide ϵ -aminorühmadelt. Kui kontekstist ei tulene teisiti, osutab 10 mõiste "histoon" mistahes liigi ükskõik millisele histoonvalgule, mille hulka kuuluvad H1, H2A, H2B, H3, H4 ja H5. Inimese HDAC valkude või geeniproduktide hulka kuuluvad, kuid ei piirdu nendega, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDACs-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9, HDAC-10 ja HDAC-11. Histooni deatsetülaas 15 võib pärineda ka algloomast või seenest.

- Mõistet "histooni deatsetülaasi inhibiitor" või "inhibiitor histooni deatsetülaasi jaoks" kasutatakse, et osutada ühendile, mis on võimeline interakteeruma histooni deatsetülaasiga ja selle aktiivsust, täpsemalt öeldes ensüümaktiivsust, pärssima. Histooni 20 deatsetülaasi ensüümaktiivsuse pärssimine tähendab histooni deatsetülaasi võime vähendamist eemaldada atsetüülühma histoonilt või muult valksubstraadilt. Eelistatult on see pärssimine spetsiifiline, s.o histooni deatsetülaasi inhibiitor vähendab histooni deatsetülaasi võimet histoonilt või muult valksubstraadilt atsetüülühma eemaldada kontsentratsioonil, mis on madalam kui inhibiitori kontsentratsioon, mida on vaja mõne 25 muu erineva bioloogilise toime saamiseks.

- Mõistet "klass-I ja klass-IIb HDAC-de suhtes kombineeritud aktiivsusega HDAC inhibiitorid" või "klass-I ja klass-IIb HDAC-de pärssimine" kasutatakse, et osutada ühenditele, mis vähendavad nii klass-I HDAC perekonna liikme (HDAC 1-3 või 8) kui 30 klass IIb HDAC perekonna liikme (HDAC 6 või 10) ensüümaktiivsust kontsentratsioonil, mis on madalam kui inhibiitori kontsentratsioon, mida on vaja muude HDAC ensüümi klasside, nagu näiteks klass-IIa, pärssimise saamiseks või

kontsentratsioonil, mis on madalam kui inhibiitori kontsentratsioon, mida on vaja mõne muu sarnase bioloogilise toime pärssimise saamiseks.

- Siinkasutatuna on mõisted "proteasoom" ja "ubikvitiin-proteasoomi süsteem (UPS – *ubiquitin-proteasome system*)" ette nähtud osutama kõigi UPS komponentide mistahes struktuuridele ja funktsioonidele, mille hulka kuuluvad, kuid ei piirdu nendega:
- a) ubikvitiin (Ub) ja ubikvitiinilaadsed valgud (Ulp); s.o SUMO, NEDD8, ISG15 jms,
 - b) ubikvitiini monomeerid, K48-seotud polüubikvitiini ahelad, K63-seotud polüubikvitiini ahelad jms,
 - c) E1 ubikvitiin-aktiveeritavad ensüümid; s.o E1^{Ub}, E1^{SUMO}, E1^{NEDD8}, E1^{ISG15} jms,
 - d) E1 ubikvitiin-aktiveeritavate ensüümide allühikud; s.o APPBP1, UBA3, SAE1, SAE2 jms,
 - e) E2 ubikvitiin-konjugeeritud ensüümid; s.o UBC9, UBC12, UBC8 jms,
 - f) E3 ubikvitiini ligaasid; s.o RING-sõrm E3s, lihtne RING-sõrm E3s, kuliinipõhine RING-sõrm E3s, RBX1-/RBX2-sõltuv E3s, HECT-domeen E3s, U-box E3s jms,
 - g) SCF (SKP1-kulliini-1-F-box) E3 ubikvitiini ligaasi kompleks, s.o SCF^{SKP2}, SCF^{B-TRCP}, SCF^{FBW7} jms,
 - h) kulliinid, s.o CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5 jms,
 - i) F-box valgud, s.o SKP2, B-TRCP valgud, FBW valgud jms,
 - j) muud substraadispetsiifilised adapterid, s.o BTB valgud, SOCS-box valgud, DDB1/2, VHL jms,
 - k) proteasoom, selle komponendid jms,
 - l) metalloisopeptidaas RPN11, proteasoomi kaane allühik, mis deubikvineerib UPS sihtmärgid enne nende lagundamist, jms,
 - m) metalloisopeptidaas CSN5, COP9-signalosoomi kompleksi allühik, mis vastutab NEDD8 eemaldamise eest kulliinidelt, jms,
 - n) aktiveerimisetapp, mille viib läbi E1 ubikvitiin-aktiveeritav ensüüm, milles Ub/Ulp esmalt adenüülitakse C-terminaalsel glütsiinjäägil ja seejärel saab ta taas C-terminuses laengu tioolestrina,
 - o) Ub/Ulp ülekanne E1 ubikvitiin-aktiveeritavatelt ensüümidelt E2 ubikvitiin-konjugeeritud ensüümile,
 - p) ubikvitiin-konjugaadi äratundmine,

- q) substraat-ubikvitiini kompleksi ülekanne ja sidumine proteasoomiga,
- r) ubikvitiini eemaldamine või
- s) substraadi degradeerimine.

5 Mõistet "proteasoomi inhibiitor" ja "ubikvitiin-proteasoomi süsteemi inhibiitor" kasutatakse siin, et osutada ühendile, mis on võimeline interakteeruma mõne normaalse, muudetud, üliaktiivse või üleekspresseeritud UPS komponendiga ja pärsib selle aktiivsust, täpsemalt ensüümaktiivsust. UPS ensüümaktiivsuse pärssimine tähendab UPS komponendi võime vähendamist toimet avaldada. Eelistatult on see pärssimine

10 spetsiifiline, s.o proteasoomi inhibiitor vähendab UPS komponendi aktiivsust kontsentratsioonil, mis on madalam kui inhibiitori kontsentratsioon, mida on vaja mõne muu erineva bioloogilise toime saamiseks. UPS komponendi aktiivsuse inhibiitorite hulka kuuluvad, kuid ei piirdu nendega:

- a) Ub või Ulp adenüülimise inhibiitorid, mis blokeerivad Ub/Ulp ligipääsu
- 15 adenüülimissaidile või blokeerivad ATP ligipääsu; s.o imatiniib (Gleevec; Novartis) jms,
- b) E3 või E3-kompleksi ja E2 interaktsiooni segajad,
- c) substraadi ja E3 või E3-kompleksi substraadi interaktsioonidomeeni vahelise interaktsiooni katkestajad, mis blokeerivad näiteks p53 (substraat) ja MDM2 (RING-
- 20 sõrm E3) vahelist interaktsiooni, s.o nutliinid (sidudes MDM2), RITA (sidudes p53 N-terminuse) jms,
- d) E3 ligaasi kompleksi lõhkujad,
- e) kunstlikud substraatide ubikvitiini ligaaside juurde suunajad, s.o PRAOTAC valgud (PROTAC – *Proteolysis Targeting Chimera*) jms,
- 25 f) proteasoomi ja selle komponentide inhibiitorid, s.o bortesomiib, karfilsomiib, NPI-0052, Bsc2118 jms,
- g) ubikvitiin/Ulp eemaldamise inhibiitorid, näiteks metalloisopeptidaaside RPN11 ja CSN5 inhibiitorid, või
- h) polüubikvitiinahela muutjad, s.o ubistatiinid jms.

30

Ülalnimetatud farmatseutiliselt vastuvõetavad happeliitsoolad on mõeldud hõlmama terapeutiliselt aktiivseid mittetoksilisi happeliitsoola vorme, mida ühendid valemiga (I) võivad moodustada. Ühendid valemiga (I), millel on aluselised omadused, võib muuta

farmatseutiliselt vastuvõetavateks happeliitsooladeks mainitud alusevormi sobiva happega töödeldes. Sobivate hapete hulka kuuluvad näiteks anorgaanilised happed nagu vesinikhalogeniidhapped, näiteks vesinikkloriid- või vesinikbromiidhape; väävel-; lämmastik-; fosforhape jms; või orgaanilised happed, näiteks äädik-, trifluoroäädik-, propaan-, hüdroksüäädik-, piim-, püruvaat-, oksaal-, maloon-, merevaik- (s.o butaandioolhape), male-, fumaar-, õun-, viin-, sidrun-, metaansulfoon-, etaansulfoon-, benseensulfoon-, p-tolueensulfoon-, tsüklaam-, salitsüül-, p-amino-salitsüül-, pamoehape jms.

10 Ühendid valemiga (I), millel on happelised omadused, võib muuta farmatseutiliselt vastuvõetavateks aluseliitsooladeks mainitud happevormi sobiva orgaanilise või anorgaanilise alusega töödeldes. Sobivate alusesoola vormide hulka kuuluvad näiteks ammoniumisoolad, leelis- ja leelismuldmetalli soolad, näiteks liitiumi-, naatriumi-, kaaliumi-, magneesiumi-, kaltsiumisoolad jms, orgaaniliste aluste soolad, näiteks
15 bensatiini-, N-metüül-D-glükamiini-, hüdrabamiinisoolad, ning aminohapete, näiteks arginiini, lüsiini jms soolad.

Mõisted happe- või aluseliitsool hõlmavad ka hüdraate ja solvendi liitvorme, mida ühendid valemiga (I) võivad moodustada. Selliste vormide näideteks on hüdraadid,
20 alkoholaadid jms.

Mõiste ühendite valemiga (I) stereokeemiliselt isomeersed vormid tähendab siinkasutatuna kõiki võimalikke ühendite valemiga (I) puhul esineda võivaid ühendeid, mis on moodustunud samadest aatomitest, on seotud sidemetega samas järjestuses, kuid
25 millel on erinevad kolmemõõtmelised struktuurid, mis ei ole samaväärsed. Kui ei ole teisisti öeldud või näidatud, hõlmab ühendi keemiline nimetus kõigi võimalike stereokeemiliselt isomeersete vormide segu, mis mainitud ühendi puhul võivad esineda. Mainitud segu võib sisaldada mainitud ühendi molekulaarse põhistruktuuri kõiki diastereomeere ja/või enantiomeere. Kõik ühendite valemiga (I) stereokeemiliselt
30 isomeersed vormid nii puhtal kujul kui üksteise seguna kuuluvad käesoleva leiutise ulatusse.

Mõned ühendid valemiga (I) võivad esineda ka tautomeersete vormidena. Sellised vormid kuuluvad hoolimata sellest, et need ei vasta täpselt ülalesitatud valemile, käesoleva leiutise ulatusse.

- 5 Ükskõik kus siin kasutatuna hõlmab mõiste "ühendid valemiga (I)" ka farmatseutiliselt vastuvõetavaid happe- või aluseliitsooli ja kõiki stereoisomeerseid vorme.

- Käesoleva leiutise kohaselt kasutamiseks sobivaks proteasoomi inhibiitoriks on bortesomiib. Bortesomiib on kaubanduses saadaval firmalt Millennium kaubanime all
- 10 Velcade ja seda võib valmistada näiteks nii, nagu kirjeldatakse publikatsioonides EP788360, EP1312609, EP1627880, US 6066730 ja US 6083903 või sarnaste meetodite abil.

- See leiutis käsitleb ka leiutisekohaseid kombinatsioone kasutamiseks meditsiinilises
- 15 ravis näiteks tuumorirakkude kasvu pärssimiseks.

See leiutis käsitleb leiutisekohaste kombinatsioonide kasutamist tuumorirakkude kasvu pärssimiseks ette nähtud ravimkompositsiooni valmistamiseks.

- 20 See leiutis käsitleb ka kombinatsiooni kasutamiseks tuumorirakkude kasvu pärssimiseks inimesel, mis hõlmab isikule tõhusa koguse leiutisekohase kombinatsiooni manustamist.

- Veel hõlmab see leiutis kombinatsiooni kasutamiseks ebanormaalse rakukasvu pärssimiseks, sealhulgas transformeerunud rakkude puhul, tõhusas koguses
- 25 leiutisekohast kombinatsiooni manustades. Ebanormaalne rakukasv osutab rakukasvule, mis ei sõltu normaalsetest reguleerivatest mehhanismidest (nt kontaktinhibitsiooni kadu). Siia kuuluvad tuumori kasvu pärssimine nii otseselt vähirakkude kasvu peatumist, terminaalset diferentseerumist ja/või apoptoosi põhjustades kui ka kaudselt vähirakkude migreerumist, invasiooni ja ellujäämist või tuumorite neovaskularisatsiooni pärssides.

30

See leiutis käsitleb ka kombinatsiooni kasutamiseks tuumori kasvu pärssimiseks manustades tõhusas koguses leiutisekohast kombinatsiooni sellist ravi vajavale isikule, näiteks imetajale (ja täpsemalt öeldes inimesele). Täpsemalt öeldes käsitleb see leiutis

kombinatsiooni kasutamiseks tuumorite kasvu pärssimiseks tõhusas koguses leiutisekohast kombinatsiooni manustades. Käesolev leiutis on eriti kasulik pankreasevähi, lümfoitse liini hematopoeetiliste tuumorite, näitkes ägeda lümfoblastse leukeemia, ägeda müelogeense leukeemia, ägeda promüelotsüütse leukeemia, ägeda müeloidse leukeemia, ägeda monotsüütse leukeemia, lümfoomi, kroonilise B-raku leukeemia, kroonilise müeloidse leukeemia, blastses kriisis kroonilise müeloidse leukeemia, Burkitti lümfoomi, hulgimüeloomi, mitteväikerakk-kopsuvähi, väikerakk-kopsuvähi, mitte-Hodgkini lümfoomi, melanoomi, eesnäärmevähi, rinnavähi ja käärsoolevähi raviks. Tuumorite näidete hulka võivad kuuluda, kuid ei piirdu nendega, follikulaarne kilpnäärmevähk, müelodüsplastiline sündroom (MDS), mesenhümaalset päritolu tuumorid (nt fibrosarkoomid ja rhabdomüosarkoomid), teratokartsinoomid, neuroblastoomid, glioomid, healoomulised nahatuumorid (nt keratoakantoomid), neerukartsinoom, munasarjakartsinoom, põiekartsinoom ja epidermaalne kartsinoom.

See leiutis käsitleb veel kombinatsiooni kasutamiseks ägeda lümfoblastse leukeemia, ägeda müelogeense leukeemia, ägeda promüelotsüütse leukeemia, ägeda müeloidse leukeemia, ägeda monotsüütse leukeemia, lümfoomi, kroonilise B-raku leukeemia, kroonilise müeloidse leukeemia, blastses kriisis kroonilise müeloidse leukeemia, Burkitti lümfoomi ja hulgimüeloomi ravis manustades tõhusas koguses histooni deatsetülaasi inhibiitorit valemiga (I) sellist ravi vajavale isikule, näiteks imetajale (ja täpsemalt öeldes inimesele).

See leiutis käsitleb veel kombinatsiooni kasutamiseks selliste ravimiresistentsete tuumorite ravis nagu, kuid nendega mitte piirdudes, lümfoitse liini hematopoeetilised tuumorid, näiteks ravimiresistentne äge lümfoblastne leukeemia, ravimiresistentne äge müelogeenne leukeemia, ravimiresistentne äge promüelotsüütne leukeemia, ravimiresistentne äge müeloidne leukeemia, ravimiresistentne äge monotsüütne leukeemia, ravimiresistentne lümfoom, ravimiresistentne krooniline B-raku leukeemia, ravimiresistentne krooniline müeloidne leukeemia, blastses kriisis ravimiresistentne krooniline müeloidne leukeemia, ravimiresistentne Burkitti lümfoom ja ravimiresistentne hulgimüeloom, manustades tõhusas koguses histoon deatsetülaasi inhibiitorit valemiga (Ia) või selle kombinatsiooni bortesomiibiga sellist ravi vajavale isikule, näiteks imetajale (ja täpsemalt öeldes inimesele). Käesolev leiutis on eriti sobiv

ravimiresistentse hulgemüeloomi, täpsemalt proteasoomi inhibiitorite suhtes resistentse hulgemüeloom raviks, veel täpsemalt bortesomiibi resistentse hulgemüeloomi raviks.

Mõiste "ravimiresistentne hulgemüeloom" hõlmab, kuid ei piirdu nendega, ühele või mitmele järgmiste seast valitud ravimile resistentset hulgemüeloomi: talidomiid, deksametasoon, revlimiid, doksorubitsiin, vinkristiin, tsüklofosfamiid, pamidronaat, melfalaan, defibrotiid, prednisoon, darinaparsiin, belinostat, vorinostat, PD 0332991, LBH589, LAQ824, MGCD0103, HuLuc63, AZD 6244, pasopaniib, P276-00, plitidepsiin, bendamustiin, tanespimütsiin, ensastauriin, perifosiin, ABT-737 või RAD001. Mõiste "ravimiresistentne hulgemüeloom" hõlmab ka relapseeruvat või refraktoorse hulgemüeloomi.

Mõiste "ravimiresistentne" tähendab seisundit, mille puhul avaldub loomulik resistentsus või omandatud resistentsus. "Loomulik resistentsus" tähendab vastavate radade võtmegeenide iseloomulikku ekspresseerumisprofiili vähirakkudes, mille hulka kuuluvad, kuid ei piirdu nendega, apoptoos, rakkude arenemine ja DNA parandamine, mis soodustab vähirakkude võimet kiiremini kasvada nende normaalsete analoogidega võrreldes. "Omandatud resistentsuse" all peetakse silmas mitmetest teguritest põhjustatud nähtust, mis viib tuumori moodustumise ja arenemiseni, mis võib mõjutada vähirakkude tundlikkust ravimi suhtes. Omandatud resistentsus võib olla seotud mitmete mehhanismidega nagu näiteks, kuid nendega mitte piirdudes, muutused ravimi sihtmärkides, ravimi kogunemise vähenemine, muutused rakusiseses ravimi jaotumises, ravim-sihtmärk vähenenud interaktsioon, suurenenud detoksifikatsioonivastus, rakutsükli deregulatsioon, suurenenud kahjustatud-DNA parandamine ja vähenenud apoptootiline vastus. Mitmed nimetatud mehhanismid võivad esineda samaaegselt ja/või üksteist mõjutada. Nende aktiveerumise ja/või inaktiveerumise põhjus võib olla geneetiline või epigeneetiline sündmus või onkoviraalsete valkude esinemine. Omandatud resistentsus võib avalduda üksikute ravimite suhtes, kuid võib esineda ka laiemalt paljude erinevate ravimite suhtes, millel on erinevad keemilised struktuurid ja erinev toimemehhanism. Seda resistentsuse vormi kutsustakse mitmeravimi resistentsuseks.

Leiutisekohast kombinatsiooni võib kasutada muudel ravieesmärkidel, näiteks:

- a) tuumorite sensibiliseerimine kiiritusravi suhes manustades leiutisekohast ühendit enne tuumori vähi raviks kiiritamist, selle ajal või pärast seda;
- b) selliste artropaatiate ja osteopatoloogsete seisundite ravi nagu reumatoidartriit, osteoartriit, juveniilne artriit, podagra, polüartriit, psoriaatiline artriit, anküloseeruv spondüliit ja süsteemne erütematoosluupus;
- 5 c) silelihaste rakuproliferatsiooni, sealhulgas vaskulaarsete proliferatiivsete häirete, ateroskleroosi ja restenoosi pärssimine;
- d) selliste põletikuliste seisundite ja dermaalsete seisundite ravimine nagu haavandiline koliit, Crohni tõbi, allergiline riniit, transplantaat peremehe vastu tõbi, konjunktiviit, astma, ARDS, Behçeti tõbi, transplantaadi äratõukereaktsioon, utikaaria, allergiline dermatiit, areaatalopeetsia, skleroderma, eksanteem, ekseem, dermatomüosiit, akne, diabeet, süsteemne erütematoosluupus, Kawasaki tõbi, hulgiskleroos, emfüseem, tsüstiline fibroos ja krooniline bronhiit;
- 10 e) endometrioosi, emakafibroidide, düsfunktsionaalse emakaverejooksu ja endomeetriumi hüperplaasia ravimine;
- f) okulaarse vaskularisatsiooni, sealhulgas võrkkesta ja soonkesta veresooni mõjutava vaskulopaatia, ravimine;
- 15 g) südamehäirete ravimine;
- h) immuunosupressiivsete seisundite pärssimine, näiteks HIV infektsioonide ravimine;
- 20 i) neeruhäirete ravimine;
- j) endokriinsete häirete pärssimine;
- k) glükoneogeneesi häirete pärssimine;
- l) neuropatoloogia, näiteks Parkinsoni tõve, või kognitiivsest häirest põhjustatud neuropatoloogia, näiteks Alzheimeri tõve, või polüglutamiiniga seotud neuronaalsete haiguste ravimine;
- 25 m) psühhiaatriliste häirete, näiteks skisofreenia, bipolaarse häire, depressiooni, ärevuse ja psühhoosi ravimine;
- n) neuromuskulaarse patoloogia, näiteks amülotroofse lateraalskleroosi pärssimine;
- 30 o) spinaalse lihaskatroofia ravimine;
- p) muude geeniekspressiooni potenseerimisele alluvate haigusseisundite ravimine;
- q) geeniteraapia võimendamine;
- r) adipogeneesi pärssimine;

s) parasitooside nagu malaaria ravimine.

Seega käsitleb käesolev leiutis ülalkirjeldatud kombinatsioone kasutamiseks ravimina ning samuti HDAC inhibiitori valemiga (Ia), millel on kombineeritud aktiivsus klass-I ja klass-IIb HDAC-de suhtes, kasutamist koos bortesomiibiga ühe või mitme ülalnimetatud 5 seisundi raviks ette nähtud ravimi valmistamiseks.

Seega käsitleb käesolev leiutis HDAC inhibiitori valemiga (Ia), millel on kombineeritud aktiivsus klass-I ja klass-IIb HDAC-de suhtes, kasutamist koos bortesomiibiga ägeda 10 lümfoblastse leukeemia, ägeda müelogeense leukeemia, ägeda promüelotsüütse leukeemia, ägeda müeloidse leukeemia, ägeda monotsüütse leukeemia, lümfoomi, kroonilise B-raku leukeemia, kroonilise müeloidse leukeemia, blastses kriisis kroonilise müeloidse leukeemia, Burkitti lümfoomi ja hulgimüeloomi raviks ette nähtud ravimi valmistamiseks.

15

Veel käsitleb see leiutis HDAC inhibiitori valemiga (Ia), millel on kombineeritud aktiivsus klass-I ja klass-IIb HDAC-de suhtes, kasutamist koos bortesomiibiga selliste ravimiresistentsete tuumorite raviks ette nähtud ravimi valmistamiseks, nagu näiteks, kuid nendega mitte piirdudes, lümfoidse liini hematopoeetilised tuumorid, näiteks 20 ravimiresistentne äge lümfoblastne leukeemia, ravimiresistentne äge müelogeenne leukeemia, ravimiresistentne äge promüelotsüütne leukeemia, ravimiresistentne äge müeloidne leukeemia, ravimiresistentne äge monotsüütne leukeemia, ravimiresistentne lümfoom, ravimiresistentne krooniline B-raku leukeemia, ravimiresistentne krooniline müeloidne leukeemia, blastses kriisis ravimiresistentne krooniline müeloidne leukeemia, 25 ravimiresistentne Burkitti lümfoom ja ravimiresistentne hulgimüeloom.

Veel käsitleb see leiutis HDAC inhibiitori valemiga (Ia), millel on kombineeritud aktiivsus klass-I and klass-IIb HDAC-de suhtes, kasutamist koos bortesomiibiga ravimiresistentse hulgimüeloomi, täpsemalt öeldes proteasoomi inhibiitoritele resistentse 30 hulgimüeloomi, veel täpsemalt bortesomiibi resistentse hulgimüeloomi, raviks ette nähtud ravimi valmistamiseks.

Bortesomiibi ja HDAC inhibiitori valemiga (Ia) võib manustada samaaegselt (näiteks eraldi või ühe kompositsioonina) või üksteise järel. Viimatinimetatud juhul manustatakse kaks ühendit sellise aja jooksul ning sellises koguses ja viisil, millest piisab soodsa või sünergistliku toime saamiseks

5

Veel käsitleb see leiutis toodet, mis sisaldab esimese toimeainena HDAC inhibiitorit valemiga (Ia) (I) ja bortesomiibi kombinatsioonpreparaadis samaaegseks, eraldi või järjestikkuseks kasutamiseks vähktõve põdevate patientide raviks.

- 10 Erialaspetsialist võib lihtsalt määrata tõhusa koguse siin allpool kirjeldatud analüüside tulemuste alusel. Üldiselt loetakse ühendi valemiga (I) ja proteasoomi inhibiitori terapeutiliselt tõhusaks koguseks 0,005 mg/kg kuni 100 mg/kg kehakaal ja täpsemalt öeldes 0,005 mg/kg kuni 10 mg/kg kehakaal. Sobiv võib olla manustada vajalik doos kahe, kolme, nelja või rohkema alamdoosina sobivate ajavahemike järel päeva jooksul.
- 15 Mainitud alamdoosid võivad olla ühikuliste manustamisvormidena, sisaldades näiteks 0,5 kuni 500 mg ja täpsemalt öeldes 10 mg kuni 500 mg toimeainet manustamisvormi ühiku kohta.

- Kasulikest farmakoloogilistest omadustest sõltuvalt võivad leiutisekohaste
- 20 kombinatsioonide komponendid olla manustamise jaoks erinevate ravimvormidena. Komponendid võivad olla eraldi erinevates ravimkompositsioonides või ühes mõlemat komponenti sisaldavas ravimkompositsioonis.

- Seega käsitleb leiutis ka ravimkompositsiooni, mis sisaldab bortesomiibi ja HDAC
- 25 inhibiitorit valemiga (Ia) koos ühe või mitme farmatseutilise kandajaga. Leiutises kasutamiseks ette nähtud ravimkompositsioonide valmistamiseks segatakse tõhus kogus konkreetset ühendit aluse- või happeliitsoola vormis toimeainetena ühtlaseks seguks farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga, kusjuures see kandja võib olla erinevas vormis sõltuvalt manustamiseks soovitud preparaadi vormist. Need ravimkompositsioonid on
- 30 eelistatult ühikulise manustamisvormina, mis on eelistatult ette nähtud manustamiseks suukaudselt, rektaalselt, perkutaanselt või parenteraalselt süstides. Näiteks valmistades kompositsioone suukaudsete manustamisvormidena, võib kasutada mistahes tavalisi farmatseutilisi keskkondi, nagu näiteks vesi, glükoolid, õlid, alkoholid jms suukaudsete

vedelpreparaatide puhul nagu suspensioonid, siirupid, eliksiirid ja lahused; või tahkeid kandjaid nagu tärglised, suhkrud, kaoliin, lubrikandid, sideained, murendavad ained jms pulbrite, pillide, kapslite ja tablettide puhul. Lihtsa manustamise tõttu on tabletid ja kapslid kõige eelistatuteks suukaudseteks manustamisvormideks, mille puhul kasutatakse mõistagi tahkeid farmatseutilisi kandjaid. Parenteraalsete kompositsioonide puhul sisaldab kandja tavaliselt steriilset vett, vähemalt suures osas, kuhu võib näiteks lahustumise soodustamiseks lisada teisi koostiosi. Valmistada võib näiteks süstelahuseid, mille puhul kandja sisaldab soolalahust, glükoosilahust või soola- ja glükoosilahuse segu. Valmistada võib ka süstesuspensioone, mille puhul võib kasutada sobivaid vedelaid kandjaid, suspendeerivaid aineid jms. Perkutaanseks manustamiseks ette nähtud kompositsioonide puhul sisaldab kandja valitavalt läbivust võimendavat ainet ja/või sobivat märguvat ainet, mis on valitavalt ühendatud väiksemates kogustes ükskõik millist tüüpi sobivate lisaainetega, kusjuures need lisaained ei avalda nahale märkimisväärset kahjulikku mõju. Mainitud abiained võivad soodustada manustamist nahka ja/või olla abiks soovitud kompositsioonide valmistamisel. Need kompositsioonid võib manustada erinevatel viisidel, näiteks transdermaalse plaastri, täpilahuse või salvina.

Eriti eelistatud juhul valmistatakse ülalmainitud ravimkompositsioonid ühikulise manustamisvormina lihtsama manustamise ja doosi ühtsuse pärast. Ühikuline manustamisvorm osutab siin leutiskirjelduses ja patendinõudluses kasutatuna füüsiliselt eraldiolevatle ühikutele, mis sobivad ühikulisteks doosideks, kusjuure iga ühik sisaldab kindlaksmääratud koguses toimeainet, mis on arvestatud andma soovitud ravitoimet, koos vajaliku farmatseutilise kandajaga. Selliste ühikuliste manustamisvormide näideteks on tabletid (sealhulgas poolitusjoonega või kaetud tabletid), kapslid, pillid, pulbripakikesed, oblaadid, süstelahused või -suspensioonid, teelusikatäied, supilusikatäied jms ning nende eraldiolevad kordused.

Sobiv võib olla kombinatsiooni iga komponendi vajaliku doosi manustamine kahe, kolme, nelja või enama alldoosina sobivate ajavahemike jäel ravi käigus. Alldoosid võivad olla ühikuliste manustamisvormdena, sisaldades näiteks kõigil juhtudel sõltumatult 0,01 kuni 500 mg, näiteks 0,1 kuni 200 mg ja täpsemalt öeldes 1 kuni 100 mg igat toimeainet manustamisvormi ühiku kohta.

Mõiste "histoonide või muude valkude atsetüülimise indutseerimine" tähendab selliste HDAC substraatide atsetüülimisoleku indutseerimist nagu, kuid nendega mitte piirdudes, histoonid, näiteks histoon 3, histoon 4 jms; tubuliin, näiteks alfa-tubuliin jms; kuumašoki valgud, näiteks Hsp 90 jms.

Mõiste "mainitud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimine" tähendab sekundaarseid toimeid nagu, kuid nendega mitte piirdudes, Hsp70 indutseerimine, p21 indutseerimine jms.

10

Veel kirjeldatakse meetodit HDAC inhibiitori valemiga (I) analüüsimist kas üksi või koos proteasoomi inhibiitoriga, mis hõlmab proovis histoonide või muude valkude indutseerimise või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude atsetüülimise indutseerimise ulatuse määramist. Täpsemalt öeldes käsitleb leiutis meetodit HDAC inhibiitori valemiga (I) kas üksi või koos proteasoomi inhibiitoriga analüüsimiseks, mis hõlmab järgmiste näitajate määramist proovis:

- a) histoon 3 atsetüülimise indutseerimine, histoon 4 atsetüülimise indutseerimine või p21 indutseerimine ja
- b) alfa-tubuliini atsetüülimise indutseerimine, Hsp 90 atsetüülimise indutseerimine või of Hsp 70 indutseerimine.

Eelkõige käsitleb leiutis ülalkirjeldatud meetodit, kusjuures indutseerimise saamiseks vajalik kontsentratsioon on a) puhul samas vahemikus nagu kontsentratsioon indutseerimise saamiseks b) puhul.

Histoonide või muude valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise ulatuse määramine proovis võib hõlmata ravile vastavate patsientide tuvastamist ja seega võib see olla kasulik inimese vähktõve raviks.

Histoonide või muude valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise ulatuse määramine

proovis võib hõlmata ravi tõhususe jälgimist patsientidel ja seega võib see olla kasulik inimese vähktõve raviks.

- 5 Histoonte või muude valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise ulatuse määramine proovis võib hõlmata terapeutiliste vastuste ennustamist ravile ja seega võib see olla kasulik inimese vähktõve raviks.

- 10 Seega kirjeldatakse siin ka HDAC inhibiitori valemiga (Ia), millel on kombineeritud aktiivsus klass-I ja klass-IIb HDAC-de suhtes, kasutamist koos bortesomiibiga, kusjuures histoonte või muude valkude hüperatsetüülimise indutseerimine või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise on kasulik inimese vähktõve raviks.

- 15 Proov võib pärineda rakkudest, mida on töödeldud mainitud kombinatsiooniga. Proov võib pärineda ka koest, mida mõjutab häire, ja/või isikult, keda on ravitud bortesomiibi ja valemile (Ia) vastava HDAC inhibiitori kombinatsiooniga.

- 20 Rakkudeks võivad olla rakukultuuri rakud, mis on kokku viidud manitud kombinatsiooniga. Mainitud kombinatsiooni võib lisada rakkude kasvukeskkonda.

Rakud võivad pärineda ka koest ja/või isikult, keda on ravitud mainitud kombinatsiooniga.

- 25 Eelistatult hõlmab analüüsimeetod ainult *in vitro* läbiviidud etappe. Seega vastavalt sellele teostusvariandile ei kuulu koeproovi võtmine inim- või loomorganismilt käesoleva leiutise ulatusse.

- 30 Tavaliselt töödeldakse rakke, et need oleksid histoonte või muude valkude atsetüülimise indutseerimine või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise määramiseks kasutatava meetodi jaoks sobivas seisundis. Töötlemine võib hõlmata homogeniseerimist, ekstraheerimist, fikseerimist, pesemist ja/või permeabiliseerimist. Töötlemisviis sõltub suures osas histoonte või muude

valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise määramiseks kasutatavast meetodist. Proov võib pärineda patsiendi biopsisast. Biopsiat võib täiendavalt töödelda et saada proov, mis oleks histoonide või muude valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud
5 atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise määramise meetodi jaoks kasutamiseks sobivas seisundis.

Valkude atsetüülimise ulatuse või indutseritud valgu koguse võib määrata antikeha kasutades.

10

Siinkasutatuna tähendab mõiste "antikeha" immuunoglobuliini või sellele sarnase seondumisspetsiifikaga derivaati. Leiutisekohaselt kasutatavaks antikehaks võib olla monoklonaalne antikeha või antikeha, mis on saadud või sisaldub polüklonaalses antiseerumis. Mõiste "antikeha" tähistab lisaks selliseid derivaate nagu Fab, F(ab')₂, Fv
15 või scFv fragmendid. Antikeha või selle derivaat võib olla looduslikku päritolu või see võib olla (pool)sünteesiliselt valmistatud.

Kasutada võib erialal üldtuntud Western blot analüüsi. Rakulise materjali või koe võib homogeniseerida ja seda võib töödelda denatureerivate ja/või redutseerivate ainetega
20 proovide saamiseks. Proovi võib valkude eraldamiseks laadida polüakrüülamiidgeelile, millele järgneb kandmine membraanile, või vahetult eraldada tahkel faasil. Seejärel viiakse antikeha prooviga kokku. Pärast ühte või mitut pesemisetappi kasutatakse seondunud antikeha tuvastamiseks erialal tuntud meetodeid.

25 Immuunohistokeemiat võib kasutada pärast koematerjali, näiteks tihke tuumori lõikude, fikseerimist ja permeabiliseerimist, seejärel inkubeeritakse antikeha prooviga ja pärast ühte või mitut pesemisetappi seondunud antikeha tuvastatakse.

Histoonide või muude valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud
30 atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise ulatuse võib määrata ELISA abil. Ette võib kujutada erinevaid ELISA formaate. Ühe formaadi puhul seotakse antikeha tahkele faasile, näiteks mikrotiiterplaadile, millele järgneb ebaspetsiifiliste seondumissaitide blokeerimine ja prooviga inkubeerimine. Teise

formaadi puhul viiakse proov kõigepealt kokku tahke faasiga proovis sisalduvate atsetüülitud ja/või indutseeritud valkude sidumiseks. Pärast blokeerimist ja valikuliselt pesemist viiakse antikeha kokku seotud prooviga.

- 5 Histoonte või muude valkude atsetüülimise indutseerimise või nimetatud atsetüülimisega funktsionaalselt reguleeritud valkude indutseerimise ulatuse võib määrata voolutsütomeetria abil. Rakud, näiteks rakukultuuri rakud või vererakud või luuüdist pärinevad rakud, fikseeritakse ja permeabiliseeritakse, et antikeha jõuaks atsetüülitud ja/või indutseeritud valkudeni. Pärast valikulisi pesemis- ja
- 10 blokeerimisetappe viiakse antikeha rakkudega kokku. Siis viiakse läbi voolutsütomeetria vastavalt erialal tuntud meetoditele, et tuvastada rakud, mille atsetüülitud ja/või indutseeritud valkudega on antikeha seondunud.

- Et tuvastada, kas HDAC inhibiitor või proteasoomi inhibiitori ja HDAC inhibiitori
- 15 valemiga (I) kombinatsioon on aktiivne, võib määrata valgu atsetüülimise või valgu indutseerimise ulatuse referentsproovis, kusjuures referentsproov on saadud rakkudest, mida ei ole töödeldud mainitud HDAC inhibiitori või mainitud kombinatsiooniga. Valkude atsetüülimise ulatuse ja/või indutseeritud valgu koguse määramise proovis ja referentsproovis võib läbi viia paralleelselt. Rakukultuuri rakkude puhul kasutatakse
- 20 kahte rakulist kompositsiooni, millest ühte töödeldakse mainitud HDAC inhibiitoriga või mainitud kombinatsiooniga, samas kui teine jäetakse töötlemata. Seejärel töödeldakse mõlemat kompositsiooni edasi ja määratakse vastavad valkude atsetüülimise ulatused ja/või indutseeritud valgu kogus. Teisel juhul, et määrata, kas HDAC inhibiitor või proteasoomi inhibiitori ja HDAC inhibiitori valemiga (I) kombinatsioon on aktiivne,
- 25 võib määrata rakuproliferatsiooni pärssimise.

- Patsientide puhul saadakse proov patsiendilt, keda on ravitud valemile (I) vastava HDAC inhibiitoriga või proteasoomi inhibiitori ja valemile (I) vastava HDAC inhibiitori kombinatsiooniga. Referentsproov saadakse teiselt patsiendilt, kes kannatab sama häire
- 30 all, kui keda ei ole ravitud mainitud HDAC inhibiitori või mainitud kombinatsiooniga, või tervelt isikult. Kude, millest saadakse referentsproov, vastab koele, millest on saadud proov. Näiteks kui proov pärineb rinnavähi patsiendi tuumorikoest, saadakse ka referentsproov rinnavähi patsiendi tuumorkoest või terve isiku rinnakoest. Veel on

võimalik, et proov ja referentsproov pärinevad samalt isikult. Sellisel juhul on kude, millest saadakse referentsproov, võetud isikult enne või pärast isiku ravimist mainitud HDAC inhibiitori või mainitud kombinatsiooniga. Eelistatult saadakse kude enne ravi, et välistada võimalikud inhibiitori ravi järelmõjud pärast ravi lõpetamist.

5

Eksperimentaalne osa

A. Farmakoloogiline näide

- 10 Ühendite valemiga (I) rakulise aktiivsuse, mis määrati A2780 tuumorirakkudel kolorimeerilist rakkude toksilisuse või ellujäämise analüüsi kasutades (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983), puhul viidatakse WO 2006/010750 ekperimentaalsele osale.
- 15 HDAC inhibiitorite antiproliferatiivsed toimed on seotud klass 1 HDAC-de, mille hulka kuuluvad HDAC perekonna liikmed 1-3 ja 8, pärssimisega. JNJ 26481585 toime HDAC 1 suhtes, mis immunosadestati A2780 rakkudest, ja selle mõjususe võrreldes R306465, SAHA, LBH-589 ja LAQ-824 võib leida näitest A.1. JNJ 26481585 aktiivsuse HDAC 8 inimese rekombinantse ensüümi suhtes ja selle mõjususe võrreldes R306465, SAHA,
- 20 LBH-589 ja LAQ-824 võib leida näitest A.2.

- Lisaks uuriti seda, kas R306465 mõjutab HDAC 1 substraatide histoon 3 (H3) ja histoon 4 (H4) atsetüülimise ulatust. Veel uuriti tsükliinsõltuva kinaasi inhibiitori p21^{waf1, cipl} indutseerimist A2780 munasariakartsinoomi rakkudes. P21^{waf1, cipl} pärsitakse histooni
- 25 atsetüülimise tagajärjel ja see mängib võtmerolli rakutsükli peatumise indutseerimises vastuseks HDAC inhibiitoritele (vaata näidet A.3.).

- Selleks, et hinnata HDAC 6 pärssimist ja ühendite suhtelist mõjusust HDAC 1 *versus* HDAC 6 puhul, uuriti selle substraadi tubuliini atsetüülimist ja Hsp 70 indutseerimist,
- 30 mis toimub Hsp 90 atsetüülimise tagajärjel (vaata näidet A.4.).

Näide A: ühendite valemiga (I) klass-I spetsiifilisus ja atsetüülimise toimed

Näide A.1: A2780 rakkudest immuunosadestatud HDAC 1 ensüümi pärssimine

- HDAC1 aktiivsusanalüüside jaoks immuunosadestati HDAC1 A2780 rakulüsaatidest ning inkubeeriti erinevatel kontsentratsioonidel näidatud HDAC inhibiitoriga ja [³H]atsetüül-
 5 märgistatud H4 peptiidi fragmendiga (50 000 cpm) [biotiin-(6-aminoheksaan)Gly-Ala-(atsetüül[³H]Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂)] (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). HDAC aktiivsuse hindamiseks mõõdeti vabade atsetüülühmade vabanemist. Tulemused esitati kolme sõltumatu katse keskmiste IC₅₀ väärtustena ± SD.

	HDAC 1 pärssimise IC ₅₀ (nM)
JNJ 26481585	0,16 ± 0,02
R306465	3,31 ± 0,78
SAHA	73 ± 26
LAQ-824	0,29 ± 0,05
LBH-589	0,23 ± 0,06

10

Näide A.2: inimese rekombinantse HDAC 8 ensüümi pärssimine

- Inimese rekombinantse HDAC 8 pärssimiseks kasutati HDAC 8 komplekti Colorimetric/Fluorimetric Activity Assay/Drug Discovery Kit (Biomol; kat. nr AK-508).
 15 Tulemused esitati kolme sõltumatu katse keskmiste IC₅₀ väärtustena (nM) ± SD. Analüüsid viidi läbi kahes korduses ja standardvea või IC₅₀ arvutamiseks kasutati tarkvara Graphpad Prism (Graphpad Software).

	HDAC 8 pärssimise IC ₅₀ (nM)
JNJ 26481585	34 ± 41
R306465	23 ± 17
SAHA	370 ± 314
LAQ-824	37 ± 23
LBH-589	283 ± 29

- 20 **Näide A.3: rakuliste HDAC 1 substraatide atsetüülimine ja p21^{waf1, cipl} indutseerimine**

Inimese A2780 munasarjakartsinoomi rakke inkubeeriti 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ja 3000 nM ühenditega 24 h.

Valmistati rakkude kogulüsaadid ja analüüsiti SDS-PAGE abil. Atsetüülitud H3 ja H4 histoonide tasemete, H3 valkude kogutaseme ja p21^{waf1, cipl} valgu tasemete tuvastamiseks kasutati küüliku polükloonaalseid ja hiire monokloonaalseid antikehi, millele järgnes võimendatud kemoluminestsentsi (ECL – *enhanced chemoluminescence*) tuvastamine.

Atsetüülitud H3 ja H4 tasemed tuvastati firma Upstate Biotechnology antikehadega (kat. nr 06-299 ja 06-866), H3 valkude kogutase tuvastati firma Abcam antikehadega (kat. nr ab1791) ja p21^{waf1, cipl} valgu tase tuvastati firma Transduction Laboratories antikehadega (kat. nr C24420). Sobivaid antikehalahjendusi inkubeeriti kas 1-2 h toatemperatuuril või öö jooksul 4 °C juures. Võrdse laadimise kontrollimiseks lõigati blotid ribadeks ja kordussondina kasutati hiire monokloonaalset anti-aktiin IgM (Ab-1, Oncogene Research Products). Selleks, et kontrollida tuumavalkude ekstraheerimise tõhusust lõigati blotid ribadeks ja kordussondina kasutati anti-lamiin B1 (Zymed; kat. nr 33.2000). Seejärel visualiseeriti valk-antikeha kompleksid kemoluminestsentsi (Pierce Chemical Co) või fluorestsentsi (Odyssey) abil tootjate juhiste kohaselt. Katsed viidi läbi kolm korda.

	Kontsentratsioon (nM) histoon H3 ja H4 atsetüülimise indutseerimise ning p21 ^{waf1, cipl} indutseerimise tuvastamise puhul
JNJ 26481585	10
R306465	100
SAHA	3000
LAQ-824	10
LBH-589	10

Näide A.4: tubuliini atsetüülimine ja Hsp 70 indutseerimine

Inimese A2780 munasarjakartsinoomi rakke inkubeeriti 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ja 3000 nM ühenditega 24 h.

Valmistati rakkude kogulüsaadid ja analüüsiti SDS-PAGE abil. Kogu ja atsetüülitud tubuliini tasemete tuvastamiseks kasutati antikehi firmalt Sigma: kloonid DM1A (kat. nr T9026) ja 6-111B (kat. nr T6793). Hsp 70 valk tuvastati firma Stressgen antikehaga (kat. nr SPA-810), millele järgnes ECL tuvastamine. Vastavaid antikehalahjendusi inkubeeriti kas 1-2 h toatemperatuuril või öö jooksul 4 °C juures. Võrdse laadimise kontrollimiseks lõigati blotid ribadeks ja kordussondina kautati hiire monoklonaalset anti-aktiin IgM antikeha (Ab-1, Oncogene Research Products). Tuumavalkude ekstraheerimise tõhususe kontrollimiseks lõigati blotid ribadeks ja kordussondina kasutati anti-lamiin B1 (Zymed; kat. nr 33.2000). Valk-antikeha kompleksid visualiseeriti seejärel kemoluminestsentsi (Pierce Chemical Co) või fluorestsentsi (Odyssey) abil vastavalt tootjate juhistele. Katsed viidi läbi kolm korda.

	Kontsentratsioon (nM) tubuliini atsetüülimise indutseerimise ja Hsp 70 indutseerimine alguse tuvastamise puhul
JNJ 26481585	30
R306465	1000
SAHA	100
LAQ-824	30
LBH-589	30

Näide B: inimese hematoloogilise tuumori rakuproliferatsiooni pärssimine

15

JNJ 26481585 anti-proliferatiivse aktiivsuse hindamine inimese hematoloogilise tuumori rakuliinide paneelil telliti firmast Oncodesign (Dijon, Prantsusmaa). Tuumorirakke kasvatati rakususpensioonina vastavas sobivas kasvusöötmes 37 °C juures niisutusega 5% CO₂ inkubaatoris. Mükoplasmapuhastatud tuumorirakud külvati 96-süvendilistele lamedapõhjalistele mikrotiiterplaatidele ja inkubeeriti 37 °C juures 24 h 10% FCS sisaldavas kasvusöötmes. Seejärel mõjutati tuumorirakke vehiikli (kontroll) või JNJ 26481585 suurenevate kontsentratsioonide (5 erinevat kontsentratsiooni*), bortesomiibi (5 erinevat kontsentratsiooni*) või mõlema ravimi erinevate suhete kombinatsiooniga. Seejärel inkubeeriti rakke veel 72 h. Ühendi(te) tsütotoksiline aktiivsus leiti standardse MTS analüüsi abil mõõtes absorbentsi 490 nm juures. Ühendi interaktsioonid (sünergia, aditiivsus või antagonism) arvutati mitme ravimi toime analüüsi abil ja viidi läbi

25

- keskmise võrduse printsiibile vastavalt meetodile, mida kirjeldavad Chou ja Talalay [CHOU *et al.* (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55; CHOU *et al.* (1991) *Encyclopaedia of human Biology.* Academic Press. 2: 371-379; CHOU *et al.* (1991) *Synergism and antagonism in chemotherapy.* Academic Press: 61-102; CHOU *et al.* (1994) *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 1517-1524].

*: põhineb igat ravimit ainsa ainenä kasutades eelnevalt määratud antiproliferatiivsel aktiivsusel, valiti kontsentratsioonid, mille puhul ei ületanud ühegi valitud rakuliini pärssimine 50%.

- 10 Näide B.1.: inimese hematoloogilise tuumori rakuproliferatsiooni pärssimine JNJ 26481585 abil

- Tabel F.1: tulemused on esitatud keskmise IC₄₀ väärtusena (s.o kontsentratsioon, väljendatud nM, mis on vajalik rakuproliferatsiooni 40% pärssimise saamiseks) ± SD, määratud 3 sõtumatus usaldusväärses katses.

Rakuliin	Tüüp	Keskmine	SD
CCRF-CEM	Äge lümfoblastne leukeemia	11,93	7,18
Jurkat kloon E6-1	Äge lümfoblastne leukeemia	9,22	1,78
KG-1	Äge müelogeenne leukeemia	13,39	10,48
MOLT-4	Äge lümfoblastne leukeemia	42,96	56,25
SUP-B15	Äge lümfoblastne leukeemia	1,13	
HL-60	Äge promüelotsüütne leukeemia	24,28	10,72
OCI-AML2	Äge müeloidne leukeemia	19,56	13,93
THP-1	Äge monotsüütne leukeemia	50,65	22,84
EHEB	Krooniline B-raku leukeemia	165,81	128,15
BV-173	Krooniline B-raku leukeemia	4,54	4,28
K-562	Krooniline müeloidne leukeemia	15,91	8,29
KCL-22	Krooniline müeloidne leukeemia	7,71	5,14
LAMA-84	Blastses kriisis krooniline müeloidne leukeemia	30,40	19,93
U-937	Lümfoom	23,67	10,14
Daudi	Burkitti lümfoom	9,08	1,27
Namalwa	Burkitti lümfoom	4,65	4,32
Raji	Burkitti lümfoom	26,34	16,11
Ramos	Burkitti lümfoom	4,66	2,82
ARH-77	Müeloom	40,42	24,32

Rakuliin	Tüüp	Keskmine	SD
RPMI 8226	Müeloom	6,41	5,44

Näide B.2.: inimese hematoloogilise tuumori rakuproliferatsiooni pärssimine bortesomiibiga

- 5 Tabel F.2: tulemused on esitatud keskmise IC₄₀ väärtusena (s.o kontsentratsioon, väljendatud nM, mis on vajalik rakuproliferatsiooni 40% pärssimise saamiseks) ± SD, määratud 3 sõtumatul usaldusväärses katses.

Rakuliin	Tüüp	Keskmine	SD
CCRF-CEM	Äge lümfoblastne leukeemia	4,40	0,84
Jurkat kloon E6-1	Äge lümfoblastne leukeemia	5,63	2,68
KG-1	Äge müelogeenne leukeemia	3,36	0,83
MOLT-4	Äge lümfoblastne leukeemia	12,14	12,91
SUP-B15	Äge lümfoblastne leukeemia	2,40	
HL-60	Äge promüelotsüütne leukeemia	13,38	1,99
OCI-AML2	Äge müeloidne leukeemia	11,64	11,61
THP-1	Äge monotsüütne leukeemia	5,83	0,94
EHEB	Krooniline B-raku leukeemia	6,02	0,34
BV-173	Krooniline B-raku leukeemia	2,77	0,20
K-562	Krooniline müeloidne leukeemia	12,83	4,11
KCL-22	Krooniline müeloidne leukeemia	1,74	1,56
LAMA-84	Blastses kriisis krooniline müeloidne leukeemia	2,61	0,46
U-937	Lümfoom	5,68	1,07
Daudi	Burkitti lümfoom	2,68	0,54
Namalwa	Burkitti lümfoom	4,48	1,00
Raji	Burkitti lümfoom	5,20	0,69
Ramos	Burkitti lümfoom	1,83	0,10
ARH-77	Müeloom	7,21	2,22
RPMI 8226	Müeloom	4,23	0,99

Näide B.3: inimese hematoloogilise tuumori rakuproliferatsiooni pärssimine

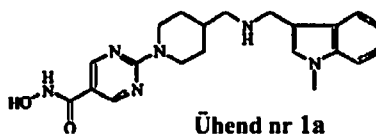
- 10 bortesomiibiga kombinatsioonis oleva JNJ 26481585 abil

Tabel 3: Tulemused on esitatud kõigi erinevate uuringute (3 sõltumatut usaldusväärset kastest) keskmiste CI väärtuste keskmise kombinatsiooni indeksina ($CI \pm SD$) ja arvutatud kõigi erinevate kombinatsioonide suhete puhul. CI väärtus alla 0,9 osutab sünergiale (hall) ja CI väärtus 0,91 ja 1,09 vahel osutab aditiivsusele (valge).

	Keskmine	SD
CCRF-CEM	0.75	0.10
Jurkat	0.80	0.15
KG-1	0.96	0.26
MOLT-4	0.85	0.17
SUP-B15	0.81	0.03
HL-60	0.81	0.24
OCI-AML2	0.71	0.12
THP-1	0.94	0.25
EHEB	0.62	0.11
BV-173	0.76	0.05
K-562	0.76	0.25
KCL-22	0.96	0.26
LAMA-84	1.05	0.27
U-937	0.67	0.06
Daudi	0.87	0.18
Namalwa	0.58	0.08
Raji	0.80	0.08
Ramos	0.89	0.36
ARH-77	0.90	0.34
RPMI 8226	0.76	0.06

PATENDINÕUDLUS

1. Kombinatsioon proteasoomi inhibiitorist, kusjuures mainitud proteasoomi inhibiitoriks on bortesomiib, ja histooni deatsetülaasi inhibiitorist, kusjuures mainitud
- 5 histooni deatsetülaasi inhibiitoriks on ühend nr 1a (JNJ26481585)



selle farmatseutiliselt vastuvõetavad happe- või aluseliitsoolad ja stereokeemiliselt isomeersed vormid.

- 10 2. Kombinatsioon vastavalt nõudluspunktile 1 ravimkompositsiooni vormis, mis sisaldab bortesomiibi ja ühendit nr 1a koos ühe või mitme farmatseutilise kandajaga.

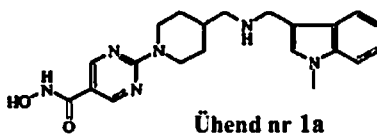
3. Kombinatsioon vastavalt nõudluspunktile 2 samaaegseks, eraldi või järjestikkuseks kasutamiseks.

15

4. Kombinatsioon vastavalt mistahes nõudluspunktile 1 kuni 3 kasutamiseks meditsiinilises ravis.

5. Mistahes nõudluspunktile 1 või 2 vastava kombinatsiooni kasutamine tuumorirakkude
- 20 kasvu pärssimiseks ettenähtud ravimi valmistamiseks.

6. Histooni deatsetülaasi inhibiitori kasutamine koos proteasoomi inhibiitoriga ägeda lümfoblastse leukeemia, ägeda müelogeense leukeemia, ägeda promüelotsüütse leukeemia, ägeda müeloidse leukeemia, ägeda monotsüütse leukeemia, lümfoomi,
- 25 kroonilise B-raku leukeemia, kroonilise müeloidse leukeemia, blastses kriisis kroonilise müeloidse leukeemia, Burkitti lümfoomi ja hulгимүeloomi raviks ette nähtud ravimi valmistamiseks, kusjuures mainitud histooni deatsetülaasi inhibiitoriks on ühend nr 1a



selle farmatseutiliselt vastuvõetavad happe- või aluseliitsoolad ja stereokeemiliselt isomeersed vormid,

ning sealjuures on mainitud proteasoomi inhibiitoriks bortesomiib.

- 5 7. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 6, kusjuures mainitud ravim on ette nähtud ravimiresistentse ägeda lümfoblastse leukeemia, ravimiresistentse ägeda müelogeense leukeemia, ravimiresistentse ägeda promüelotsüütse leukeemia, ravimiresistentse ägeda müeloidse leukeemia, ravimiresistentse ägeda monotsüütse leukeemia, ravimiresistentse lümfoomi, ravimiresistentse kroonilise B-raku leukeemia, ravimiresistentse kroonilise müeloidse leukeemia, blastses kriisis ravimiresistentse kroonilise müeloidse leukeemia, 10 ravimiresistentse Burkitti lümfoomi ja ravimiresistentse hulgimüeloomi raviks.

8. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 6 ja 7, kusjuures mainitud ravim on ette nähtud bortesomiibi resistentse hulgimüeloomi raviks.