

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037459**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.30

(21) Номер заявки
201891473

(22) Дата подачи заявки
2016.12.21

(51) Int. Cl. **A61K 31/7068** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГЕМЦИТАБИН-[ФЕНИЛ-БЕНЗОКСИ-L-АЛАНИНИЛ]ФОСФАТА В КОМБИНАЦИИ С ЦИСПЛАТИНОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ИЛИ РАКА ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ

(31) **PCT/GB2015/054158; 1609770.1**

(32) **2015.12.23; 2016.06.03**

(33) **GB**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/GB2016/054018**

(87) **WO 2017/109486 2017.06.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НУКАНА ПиЭлСи (GB)

(72) Изобретатель:
Гриффит Хью (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2005012327**

MAGDALENA SLUSARCZYK ET AL.:
"Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development", **JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY**, vol. 57, no. 4, 27 February 2014 (2014-02-27), pages 1531-1542, XP055205033, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm401853a Conclusions

LUIZ GUSTAVO OLIVEIRA BRITO ET AL.:
"Safety and efficacy of gemcitabine plus cisplatin combination in pretreated metastatic breast cancer patients", **MEDICAL ONCOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NEW YORK**, vol. 29, no. 1, 25 January 2011 (2011-01-25), pages 33-38, XP035012885, ISSN: 1559-131X, DOI: 10.1007/S12032-010-9793-8 abstract

BROWN ET AL.: "Combination of gemcitabine and cisplatin is highly active in women with endometrial carcinoma", **CANCER**, vol. 116, 1 November 2010 (2010-11-01), - 1 November 2010 (2010-11-01), pages 4973-4979, XP002755733, abstract

CHEW ET AL.: "Phase II studies of gemcitabine and cisplatin in heavily and minimally pretreated metastatic breast cancer", **J. CLIN. ONCOL.**, vol. 27, no. 13, 1 May 2009 (2009-05-01), - 1 May 2009 (2009-05-01), pages 2163-2169, XP002755734, abstract

(57) Изобретение относится к применению гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата для лечения рака в комбинации с цисплатином, где рак выбран из рака мочевого пузыря или рака желчных путей, а также к набору, содержащему два отдельных состава, при этом составы представляют собой первый состав, содержащий гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент; и второй состав, содержащий цисплатин и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент. Данное изобретение предоставляет терапию рака мочевого пузыря и рака желчных путей, которая более эффективна, чем лечение, известное из уровня техники.

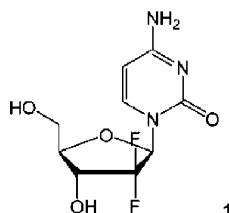
B1**037459****037459****B1**

Настоящее изобретение относится к комбинации гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата (химическое название 2'-дезоксид-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил-(бензокси-L-аланинил)]фосфат) (NUC-1031) и противоракового средства на основе платины, выбранного из цисплатина, пикоплатина, липоплатина и триплатина.

Уровень техники

NUC-1031.

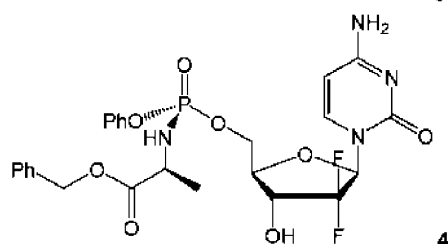
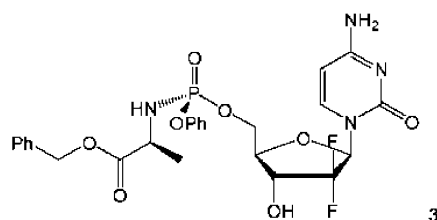
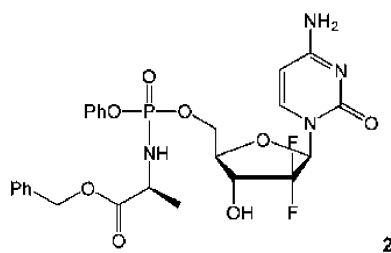
Гемцитабин (1; продаваемый на рынке как Гемзар®) представляет собой эффективный аналог нуклеозида, который в настоящее время разрешен к применению в лечении рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника и рака поджелудочной железы и широко применяется для лечения ряда других видов рака, включающих рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, колоректальный рак и лимфому.



Клиническое применение гемцитабина ограничено наличием ряда механизмов врожденной и приобретенной устойчивости. На клеточном уровне устойчивость зависит от трех параметров: i) понижающей регуляции дезоксицитидинкиназы, необходимой для превращения в активный фосфорилированный фрагмент; (ii) пониженной экспрессии транспортеров нуклеозида, в частности hENT1, необходимого для потребления раковыми клетками; и (iii) повышающей регуляции каталитических ферментов, особенно цитидиндезаминазы, которая деградирует гемцитабин.

Международная публикация WO 2005/012327 описывает серию нуклеотидных производных гемцитабина и родственных молекул нуклеозидов лекарственного средства. Среди них гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат (NUC-1031; 2) идентифицирован как наиболее эффективное соединение. Оказалось, что эти соединения не подвергаются действию многих механизмов врожденной и приобретенной резистентности, которые ограничивают применимость гемцитабина ("Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development"; Slusarczyk et al.; J. Med. Chem.; 2014, 57, 1531-1542).

NUC-1031 2 обычно получают в форме смеси двух диастереоизомеров, эпимерных при фосфатном центре (S-эпимер 3 и R-эпимер 4), которые могут быть разделены, и введение осуществляют в виде одного эписмера.



ProGem1 было первым исследованием на людях (FTIH), фаза I, открытым, двухэтапным исследованием для оценки безопасности, переносимости, клинической эффективности, фармакокинетики (ПК) и

фармакодинамики (PD) NUC-1031 в двух параллельных схемах введения у субъектов с запущенными солидными злокачественными опухолями (Номер EudraCT: 2011-005232-26). У субъектов были следующие типы опухолей при входе в исследование: колоректальный рак (7 субъектов), неизвестный первичный (3), рак яичников (12), рак молочной железы (4), рак поджелудочной железы (9), холангиокарцинома (7), рак эндометрия (3), рак шейки матки (2), рак легких (7), мезотелиома (3), рак пищевода (3), рак фаллопиевой трубы (1), трофобласт (1), рак почки (1), рак желудка (1), анальный рак (1), рак тимуса (1) и остеосаркома (1). Исследование подтвердило противоопухолевую активность NUC-1031 у пациентов с запущенными прогрессирующими типами раков, когда были исчерпаны все стандартные терапевтические варианты, многие из которых были устойчивы или резистентны к предшествующей нуклеозидной аналоговой терапии, включая использование гемцитабина. Особо следует отметить, что фармакокинетические данные показали, что NUC-1031 в качестве единственного агента генерирует приблизительно более чем 10-кратный пик внутриклеточной концентрации (C_{max}) активного трифосфатного фрагмента (dFdCTP), чем единственный агент гемцитабин в эквивалентной дозе. Более того, внутриклеточная экспозиция во времени или область под кривой (AUC) по dFdCTP была в 27 раз больше для NUC-1031 по сравнению с ранее известными данными для гемцитабина из ряда опубликованных исследований. Наконец, анализ показал, что NUC-1031 высвобождает менее половины количества потенциально токсичного метаболита 2',2'-дифтор-2'-дезоксисуридина (dFdU) по сравнению с обычным количеством, продуцируемым гемцитабином.

Рак желчных путей.

Рак желчных путей (BTC) связан с высокой смертностью (приблизительно 23 на миллион населения с частотой 0,7% злокачественных опухолей у взрослых, т.е. примерно 1200 новых случаев, зарегистрированных в Англии и Уэльсе в год. Рак желчных путей подразделяется в отношении места происхождения:

- рак желчного пузыря,
- дистальный желчный проток,
- ампулярные опухоли,
- внутрипеченочная холангиокарцинома,
- внутрипротоковая холангиокарцинома (холангиокарцинома Клатскина).

Эти раковые заболевания более распространены у пациентов в возрасте от 50 до 70 лет, с более высокой заболеваемостью у мужчин, в случае холангиокарциномы и ампулярной карциномы, а у женщин при раке желчного пузыря. Хотя более 90% BTC являются аденокарциномами, можно найти другие гистологические подтипы, такие как плоскоклеточные опухоли, нейроэндокринные опухоли, лимфомы или саркомы. Основными этиологическими факторами BTC являются желчные камни, врожденные аномалии желчных протоков, первичный склерозирующий холангит, хронические заболевания печени и наследственные синдромы полипоза.

Хирургия дает единственный шанс на выздоровление; однако из-за агрессивного характера BTC, большая часть пациентов (>65%) диагностируются на более поздних стадиях, когда операция невозможна, и когда единственной доступной терапией является паллиативная химиотерапия. Прогноз пациентов с диагнозом распространенного (метастатического или неоперабельного локально-распространенного заболевания) рака желчных путей является плохим. Пятилетняя общая выживаемость для III и IV стадий рака составляет 10 и 0% соответственно. Тем не менее, первая линия дублетной химиотерапии показала улучшение общей выживаемости и качества жизни по сравнению с терапией одним агентом.

Наиболее активными химиотерапевтическими составами для лечения BTC являются гемцитабин, фторпиримидины и платиновые агенты. В исследовании UK NCRN ABC-02 было установлено, что цисплатин и гемцитабин являются эталонным режимом лечения первой линии у пациентов с BTC. Результаты этого рандомизированного исследования III фазы, включающего 410 пациентов, для сравнения химиотерапии цисплатином/гемцитабином с дублетной терапией с монотерапией гемцитабином продемонстрировали преимущество в общей выживаемости (медиана 11,7 месяцев против 8,1 месяцев, $p < 0,001$) и выживаемость без прогрессирования (медиана 8 месяцев против 5 месяцев, $p < 0,001$). Очень похожие результаты были получены в японском рандомизированном исследовании фазы II с использованием тех же схем лечения (исследование BT-22), где медиана выживаемости 11,2 месяца была зарегистрирована при лечении с цисплатином/гемцитабином. Надежность исследования ABC-02 с учетом его размеров и наблюдаемых показателей выживания позволила установить комбинацию цисплатина и гемцитабина в качестве стандарта, и с тех пор она широко применяется в Великобритании и на международном уровне (например, см. Руководство NCCN в США).

Цель настоящего изобретения заключается в создании комбинированной терапии для лечения рака. Цель некоторых конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения заключается в создании терапии, которая более эффективна, чем лечение, известное из уровня техники.

Некоторые конкретные варианты осуществления настоящего изобретения реализуют некоторые или все вышеуказанные цели.

Сущность изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предлагается применение гемцитабин-[фенил-бензоксип-аланинил]фосфата или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата для лечения рака в комби-

нации с цисплатином, где рак выбран из рака мочевого пузыря или рака желчных путей.

Предпочтительно гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат представлен в форме свободного основания.

Согласно изобретению гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

Указанный рак является рецидивирующим или метастатическим.

Также рак может быть рефрактерным, резистентным или частично резистентным к цисплатину.

В другом варианте осуществления изобретения рак чувствителен к цисплатину.

Изобретение также обеспечивает способ лечения рака, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в комбинации с цисплатином, где рак выбран из рака мочевого пузыря или рака желчных путей.

Согласно данному способу гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат представлен в форме свободного основания.

При этом гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

Согласно изобретению рак является рецидивирующим или метастатическим.

Кроме того, рак может быть рефрактерным, резистентным или частично резистентным к цисплатину. В другом варианте осуществления изобретения рак чувствителен к цисплатину.

Лечение по изобретению основано на том факте, что комбинация этих двух средств (т.е. гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата и противоракового средства на основе платины) показывает большую эффективность при введении в комбинации по сравнению с тем, когда каждый из них вводится по-отдельности. Термин "в комбинации" или "вместе" в контексте настоящего изобретения относится к тому, что эти два средства вводят одному пациенту во время лечения. Введение может быть осуществлено по-отдельности, в том смысле, что выполняется в отдельных дозированных формах, или оно может быть в виде введения одной дозированной формы. Введение может осуществляться одновременно или последовательно или сразу же один за другим или с некоторым временным интервалом между введениями этих двух средств. Термин "только один" в контексте настоящего описания означает введение только одного активного агента и без введения другого средства во время лечения, даже спустя некоторый временной интервал.

Комбинированная терапия по изобретению включает совместное введение или последовательное введение двух активных агентов способом, который улучшает общий терапевтический результат по сравнению с введением только одного из активных агентов в течение всего периода лечения. Фармацевтический состав(ы), используемый для этой цели, может быть индивидуальным, т.е. в форме отдельных лекарственных форм или представлен в одной лекарственной форме. Каждый или любой состав может быть представлен в жидкой форме, либо уже разбавленной, либо готовой для разбавления, либо может находиться в твердой форме. Твердые формы могут быть представлены в форме, подходящей для растворения в среде соответствующего растворителя. Твердые формы также могут быть представлены в виде концентрированной стандартной лекарственной формы в виде таблеток, капсул для рассасывания и т.п.

В частности, авторы настоящего изобретения установили, что цисплатин сенситизирует некоторые конкретные линии раковых клеток, например клеточную линию рака мочевого пузыря HT1376, вместе с NUC-1031 показывая устойчивый синергический эффект. Дополнительно авторы изобретения установили, что комбинация NUC-1031 и цисплатина в условиях *in vivo* приводит к увеличению внутриклеточного t1/2 dFdCTP, что демонстрирует, что комбинация может быть эффективна для лечения злокачественных новообразований желчных путей.

Синергия, наблюдаемая для гемцитабина и соединений платины, объясняется увеличением в 1,5 раза уровня dFdCTP (гемцитабинтрифосфата) активного метаболита как гемцитабина, так и NUC-1031 (van Moorsel et al., British Journal of Cancer, 1999, 80(7), 981-990), который был описан как результат улучшения активности дезоксицитидинкиназы (dCK). Для комбинации гемцитабина и средства на основе платины были предложены два механизма увеличения dCK-опосредованных уровней dFdCTP. Первый клеточный механизм включает ингибирование рибонуклеотидредуктазы, фермента, ответственного за синтез дезоксицитидинтрифосфата (dCTP), который, как известно, ингибирует dCK (Bajetta et al., Annals of Oncology, 2003, 14, 242-247). Согласно второму молекулярному механизму, индуцированное платиной ДНК-повреждение активирует процессы восстановления нуклеотидного удаления, которые требуют дезоксирибонуклеотидов (dNTP). В свою очередь, несколько ферментов, участвующих в синтезе dNTP, регулируются, включая dCK (van Moorsel et al., 1999). NUC-1031 синтезируется как нуклеотидный аналог в монофосфатной форме, который обходит dCK-зависимое образование dFdCTP, и, следовательно, синергия, наблюдаемая при объединении NUC-1031 и цисплатина, по-видимому, происходит из другого и еще неизвестного пути.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, составляет предпочтительно между 250 и 1250 мг/м², и доза цисплатина, которую вводят при каждом введении, составляет между 10 и 200 мг/м².

Гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат может представлять собой смесь фосфатных диастереоизомеров, или она может представлять собой (S)-эпимер или (R)-эпимер, по существу, в форме

диастереомерно чистой формы, "по существу, диастереомерно чистый" определяются для целей настоящего изобретения как диастереомерно чистота более чем примерно 90%. Если присутствует в виде, по существу, в диастереоизомерно чистой форме гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат может иметь диастереоизомерную чистоту более 95, 98, 99 или даже 99,5%.

Изобретение также включает набор для использования в указанном способе, содержащий два отдельных состава, которые будут использоваться вместе, при этом составы представляют собой

первый состав, содержащий гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент;

и

второй состав, содержащий цисплатин и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В конкретных вариантах осуществления рак выбран из рака мочевого пузыря и рака желчных путей (например, рака, выбранного из рака желчного пузыря, рака дистального желчного протока, ампулярного рака, внутрипротоковой холангиокарциномы и внутриспеченочной холангиокарциномы). В некоторых конкретных предпочтительных вариантах осуществления рак выбран из рака мочевого пузыря, рака яичников и рака желчных путей (например, рака, выбранного из рака желчного пузыря, рака дистального желчного протока, ампулярного рака, внутрипротоковой холангиокарциномы и внутриспеченочной холангиокарциномы). В некоторых конкретных предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак желчных путей. В других предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Рак может представлять собой рак, который предварительно не лечили химиотерапией. В качестве альтернативы рак (например, рак желчных путей или рак мочевого пузыря) может быть рецидивирующим. Таким образом, рак может повторяться или прогрессировать после одного или нескольких предшествующих курсов химиотерапии (который может включать или не включать лечение агентом, выбранным из цисплатина, гемцитабина или гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата).

Сольват обычно представляет собой гидрат. Таким образом, гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат может быть представлен в форме соли или гидрата или сольвата (например, гидрата) соли. Также возможно, что гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат может быть представлен не в форме соли и не в форме сольвата или гидрата. Предпочтительно гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат представлен в форме свободного основания.

Возможно, введение комбинации обеспечивает $t_{1/2}$ внутриклеточного dFdCTP более 10 ч. Возможно, что введение комбинации обеспечивает $t_{1/2}$ внутриклеточного dFdCTP более 15 ч. Возможно, что введение комбинации обеспечивает $t_{1/2}$ внутриклеточного dFdCTP более 18 ч. Возможно, что введение комбинации обеспечивает $t_{1/2}$ внутриклеточного dFdCTP более 20 ч.

Гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат и противораковое средство на основе платины можно вводить одновременно или последовательно. В случае, если их вводят одновременно, их можно вводить в одной лекарственной форме или их можно вводить в отдельных лекарственных формах. Если их вводят последовательно, их можно вводить в один день, или их можно вводить в разные дни во время лечения. Возможно, что в определенные дни во время лечения гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат и противораковое средство на основе платины вводят одновременно или в один день, а в некоторые конкретные другие дни в соответствии с программой лечения вводится только одно из средств.

Составы NUC-1031.

Гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат можно вводить парентерально, например внутривенно, подкожно или внутримышечно. Предпочтительно гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

Гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат можно вводить парентерально в форме водного состава, который не обязательно также содержит полярный органический растворитель, например ДМА. В случае парентерального (например, внутривенного) введения состав предпочтительно также содержит полярный апротонный органический растворитель, например ДМА.

Гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат может содержаться в составе. Состав может представлять собой форму для разбавления определенным заранее количеством перед введением, т.е. до 48 ч (например, до 24, 12 или 2 ч) до введения.

Состав может также содержать одно или более фармацевтически приемлемых солюбилизирующих средств, например фармацевтически приемлемых неионных солюбилизирующих средств. Солюбилизирующие средства могут быть названы поверхностно-активными веществами. Иллюстративные солюбилизирующие средства включают полиэтоксилированные жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот и их смеси. Подходящие солюбилизирующие средства включают полиэтоксилированное касторовое масло (например, такое, которое продается под торговым названием Коллифор® ELP); полиэтоксилированную стеариновую кислоту (например, такую, которая продается под торговыми названиями Solutol® или Коллифор® HS15); или полиэтоксилированный (например, полиоксиэтилен (20)) сорбитанмоноолеат

(например, такой, который продается под торговым названием Твин® 80).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения состав включает более чем одно фармацевтически приемлемое солюбилизирующее средство.

Состав также может включать водный носитель. Состав согласно изобретению может быть готов для введения, в таком случае он обычно включает водный носитель.

В случае, когда гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат предпочтительно представлен в форме для парентерального введения, например для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения, в некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения, его можно вводить перорально. Предпочтительно состав предназначен для внутривенного введения. Введение может быть осуществлено посредством центрального венозного устройства введения (CVAD), или он может быть введен через периферическую вену.

Суммарная доза гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат в составе для введения обычно составляет от 250 мг до 3 г, например от 1 до 2 г, например приблизительно 1,5 г.

Составы исходного раствора.

Возможно, что полярный апротонный растворитель (например, ДМА) составляет 30% или более по объему состава.

Таким образом, может быть, что полярный апротонный растворитель (например, ДМА) составляет 50% или более, например 60% или более по объему состава. Полярный апротонный растворитель (например, ДМА) может составлять 95% или менее по объему состава, например 90% или менее. Состав может также содержать водный носитель (например, солевой раствор). Водный носитель может присутствовать в количестве 50% или менее по объему состава, например 30% или менее по объему состава. Обычно водный носитель (например, солевой раствор) будет составлять 5% или более, например 10% или более по объему состава.

Возможно, что концентрация гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в растворителе(растворителях) в составе составляет 500 мг или менее на 1 мл. Возможно, что концентрация составляет 100 мг или более на 1 мл. Предпочтительно концентрация составляет от 200 до 300 мг, например от 225 до 275 мг, например приблизительно 250 мг на 1 мл.

Некоторые предпочтительные составы содержат

от 30 до 95% по объему ДМА;

от 5 до 50% по объему водного носителя и

от 100 до 400 мг (например, от 100 до 300 мг) на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Более предпочтительные составы содержат

от 70 до 90% по объему ДМА;

от 10 до 30% по объему водного носителя (например, солевой раствор) и

от 200 до 300 мг на 1 мл гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Составы, описанные в предыдущих четырех абзацах, в которых полярный апротонный растворитель (например, ДМА), присутствует как основной компонент, могут быть, например, использованы для введения (например, инфузией или инъекцией) состава без его предварительного разбавления перед указанным введением. Они могут, например, быть введены посредством CVAD. В случае, когда введение осуществляется посредством CVAD, состав обычно не разбавляют.

Альтернативно, эти составы могут быть исходными растворами, которые должны быть разбавлены до применения, чтобы получить состав пригодный для введения, например, через периферическую вену.

Составы раствора с поверхностно-активным веществом.

Возможно, что полярный апротонный растворитель (например, ДМА) составляет 10% или более, например, 20% или более по объему состава. Таким образом, может быть, что полярный апротонный растворитель (например, ДМА) составляет 80% или менее, например 70% или менее по объему состава. Полярный апротонный растворитель (например, ДМА), может составлять 55% или менее по объему состава. Состав может также содержать один или несколько солюбилизирующих средств (например, одну или более полиэтоксигированных жирных кислот). Одно или более солюбилизирующих средств могут составлять 70% или менее по объему состава, например 60% или менее по объему состава. Обычно одно или более солюбилизирующих средств составляют 20% или больше, например 35% по объему состава. Состав может также содержать водный носитель, например, в количестве от 1 до 15% по объему или от 5 до 12% по объему.

Возможно, что концентрация гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в растворителе(ях) состава составляет 200 мг или менее на 1 мл, например 150 мг или менее или 130 мг или менее. Возможно, что концентрация составляет 40 мг или больше на 1 мл, например 60 мг или больше. Предпочтительно концентрация составляет от 70 до 120 мг на 1 мл, например приблизительно 100 мг на 1 мл.

Некоторые предпочтительные составы содержат

от 20 до 70% по объему ДМА;

от 20 до 70% по объему солюбилизирующего средства или солюбилизирующих средств и

от 50 до 150 мг гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл.

Состав может также содержать водный носитель, например, в количестве от 1 до 15% по объему. Некоторые конкретные предпочтительные составы содержат от 30 до 60% по объему ДМА; от 10 до 35% по объему первого солюбилизирующего средства; от 10 до 35% по объему второго солюбилизирующего средства; от 2 до 15% по объему водного носителя и от 50 до 150 мг на 1 мл гемцитабин- [фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл. Первым солюбилизирующим средством может быть полиэтоксилированное касторовое масло (например, такое, которое продается под торговым названием Коллифор® ELP). Второе солюбилизирующее средство может представлять собой полиэтоксилированный сорбитанмоноолеат (например, такой, который продается под торговым названием Твин® 80).

Состав может содержать от 35 до 50% по объему ДМА; от 15 до 30% по объему первого солюбилизирующего средства; от 15 до 30% по объему второго солюбилизирующего средства; от 5 до 12% по объему водного носителя и от 50 до 150 мг гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл.

Составы растворов с поверхностно-активными веществами, описанные в предыдущих пяти абзацах, в которых полярный апротонный растворитель (например, ДМА) присутствует в качестве основного компонента, обычно разбавляют водным носителем перед введением. Их обычно готовят из исходного раствора, указанного выше, и дополнительно разбавляют перед введением. После разбавления они могут быть введены через периферическую вену.

Эти составы могут быть получены из состава исходного раствора, который не содержит каких-либо солюбилизирующих средств, разбавлением раствором, который содержит солюбилизирующие средства.

Составы инфузионных растворов.

Возможно, полярный апротонный растворитель (например, ДМА), составляет 0,1% или больше, например 0,5% или больше или 1% или более по объему состава. Таким образом, возможно, что ДМА составляет 12% или менее, например 10% или менее или 8% или менее по объему состава. Состав может также содержать водный носитель (например, солевой раствор или WFI). Водный носитель может составлять 99,5% или менее по объему состава, например 99% или 98% или менее по объему состава. Обычно водный носитель составляет 80% или больше, например 95% или больше по объему состава. Состав может также содержать один или несколько солюбилизирующих средств (например, одну или более полиэтоксилированных жирных кислот). Одно или несколько солюбилизирующих средств могут составлять 12% или менее по объему состава, например 10% или менее или 8% или менее по объему состава. Обычно один или несколько солюбилизирующих средств составляют 0,1% или больше, например 0,5% или больше или 1% или больше по объему состава.

Возможно, что концентрация гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в растворителе(ях) состава составляет 15,0 мг или менее на 1 мл или 12,0 мг или менее на 1 мл, например 10,0 мг или менее или 8 мг или менее на 1 мл. Возможно, что концентрация составляет 1,0 мг или больше на 1 мл, например 2,0 мг или больше. Предпочтительно концентрация составляет от 2,5 до 12 мг на 1 мл, например от 3 мг до 11 мг на 1 мл.

Некоторые предпочтительные составы содержат от 0,1 до 10% по объему ДМА; от 0,1 до 10% по объему солюбилизирующего средства или солюбилизирующих средств; от 85 до 99% по объему водного носителя и от 2,0 до 12,0 мг гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл.

Некоторые конкретные предпочтительные составы содержат от 1 до 8% по объему ДМА; от 0,5 до 4% по объему первый солюбилизирующего средства; от 0,5 до 4% по объему второй солюбилизирующего средства; от 85 до 99% по объему водного носителя и от 2,0 до 12,0 мг гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл.

Первое солюбилизирующее средство может представлять собой полиэтоксилированное касторовое масло (например, такое, которое продается под торговым названием Коллифор® ELP). Второе солюбилизирующее средство может представлять собой полиэтоксилированный сорбитанмоноолеат (например, такой, который продается под торговым названием Твин® 80).

Составы инфузионного раствора, описанные в предыдущих четырех абзацах, в которых полярный апротонный растворитель (например, ДМА) присутствует как минорный компонент, обычно получают, разбавляя концентрированный раствор гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата водным носителем за 48 ч до введения. Указанный концентрированный раствор может быть любым раствором гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в полярном апротонном растворителе (см. раздел "Составы

исходного раствора" выше), раствором гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в смеси полярного апротонного растворителя и солюбилизирующего средства (см. раздел "Составы раствора с поверхностно-активным веществом" выше). Эти составы, в которых полярный апротонный растворитель (например, ДМА) присутствует в качестве минорного компонента, можно вводить через периферическую вену. Низкие концентрации полярного апротонного растворителя (например, ДМА) в указанном составе оказывают менее болезненное действие при периферическом введении.

Наборы.

Изобретение обеспечивает набор для лечения рака, где набор содержит первый состав, содержащий гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент;

и второй состав, содержащий противораковое средство на основе платины и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых конкретных вариантах осуществления набор может содержать

первый состав, содержащий

от 30 до 95% по объему ДМА;

от 5 до 50% по объему водного носителя и

от 100 до 400 мг (например, от 100 до 300 мг) гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл;

второй состав, содержащий противораковое средство на основе платины и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент; и

третий состав, содержащий

от 30 до 95% по объему ДМА;

от 5 до 50% по объему водного носителя.

Третий состав обычно не содержит активное вещество. Таким образом, он не содержит ни гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат, ни противораковое средство на основе платины. Третий состав может быть представлен в двух отдельных емкостях или в одной емкости.

Набор, указанный в предыдущих двух абзацах, применяется, если гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводится внутривенно через CVAD. CVAD промывается третьим составом до введения первого состава. Это уменьшает риск осаждения гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата внутри или вначале устройства для внутривенного введения, т.е. CVAD, позволяя исключить прямой контакт активного состава с водными средами (например, солевого промывного раствора). CVAD может также быть промыт третьим составом после введения первого состава. Это также дополнительно предотвращает осаждение.

В некоторых конкретных вариантах осуществления набор может содержать

первый состав, содержащий

от 30 до 95% по объему ДМА;

от 5 до 50% по объему водного носителя и

от 100 до 400 мг (например, от 100 до 300 мг) гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата на 1 мл;

второй состав, содержащий противораковое средство на основе платины и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент; и

третий состав, содержащий

от 10 до 50% по объему ДМА;

от 20 до 60% по объему первый солюбилизирующего средства;

от 20 до 60% по объему второй солюбилизирующего средства.

Обычно третий состав не содержит активное вещество. Таким образом, он не будет содержать ни гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат, ни противораковое средство на основе платины.

Набор, указанный в предыдущих двух абзацах, используется, когда гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводится внутривенно через периферическую вену. Первый состав разбавляется третьим составом за 48 ч, например за 24 ч перед введением, с получением четвертого состава. Четвертый состав дополнительно разбавляют водным носителем перед введением до желаемой концентрации с получением состава, который используется для введения в форме инфузии или инъекцией пациенту. С целью получения составов для периферического введения, которые устойчивы в отношении осаждения гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата, обычно желательно добавлять солюбилизирующие средства. Однако гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат может подвергаться разложению в присутствии таких солюбилизирующих средств. Таким образом, двухступенчатый метод разведения в некоторых конкретных вариантах осуществления по изобретению является предпочтительным средством для получения составов гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата для периферического введения.

Иллюстративная методика введения гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Иллюстративная методика для введения гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата может

быть следующей.

Раствор 250 мг/мл гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата (S-эпимер, R-эпимер или их смесь) готовили в смеси 80:20 (по объему) DMA и 0,9% солевого раствора. Этот состав исходного раствора обычно достаточно стабилен при длительных сроках хранения и транспортировке. Этот состав исходного раствора может вводиться пациентам внутривенно посредством CVAD (например, линии Хикмана, линии PICC, Portacath), например, со скоростью 20 мл/ч. Устройство для внутривенного введения обычно промывают смесью DMA и 0,9% солевого раствора (см. пример 4 ниже) 80:20 (по объему) как до, так и после введения композиции, содержащей гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат. Это помогает снизить риск возможного осаждения гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в устройстве для внутривенного введения при контакте с промывным солевым раствором. Альтернативно, когда внутривенное введение в периферическую вену является предпочтительным способом введения, состав исходного раствора затем разбавляют до 100 мг/мл раствором разбавителя, который составляет 20%:40%:40% смесь DMA:Tween® 80:Kolliphor® ELP (например, 6,7 мл 250 мг/мл гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в 80:20 DMA:0,9% солевой раствор разбавляют до 10 мл раствором DMA:Tween® 80:Kolliphor® разбавленный раствор ELP). Полученный (раствор с поверхностно-активным веществом) состав обычно стабилен в течение 5 дней. Состав инфузионного раствора затем получают разбавлением этого состава раствора с поверхностно-активным веществом до желаемой концентрации 0,9% солевым раствором.

Гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат, который вводят в ABC-08 исследовании, описанном в примерах, выполняли по приведенной методике введения, используя S-эпимер гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата, вводимый посредством CVAD.

Составы противоракового средства на основе платины.

Противораковое средство на основе платины можно вводить парентерально, например внутривенно, интраперитонеально, подкожно или внутримышечно. Предпочтительно противораковое средство на основе платины вводится внутривенно.

Противораковое средство на основе платины обычно вводят в форме водного раствора, например в виде стерильного 1 мг/мл водного раствора. Водный раствор обычно представляет собой солевой раствор (например, 0,9% солевой раствор). Водный раствор может также содержать маннит (например, 10 мг/мл).

В случае, если противораковое средство на основе платины (например, цисплатин) вводится в дозе менее 50 мг/мл, его обычно вводят в форме инфузии в объеме 100-250 мл в течение 15-60 мин. В случае, если противораковое средство на основе платины (например, цисплатин) средство вводится в дозе, превышающей или равной 50 мг/мл, его обычно вводят в форме инфузии в объеме 250-500 мл в течение с 15-60 мин.

Дополнительная информация о введении цисплатина доступна, например, на одобренной США FDA этикетке для Platinol®.

Режимы дозировки.

Возможно, что NUC-1031 вводится дважды в 21-дневном цикле. Возможно, что противораковое средство на основе платины (например, цисплатин) вводится дважды в 21-дневном цикле. В предпочтительном режиме дозировки NUC-1031 вводится на день 1 и день 8 из 21-дневного цикла. Возможно, что противораковое средство на основе платины (например, цисплатин) вводится на день 1 и день 8 из 21-дневного цикла. Возможно, что NUC-1031 и противораковое средство на основе платины (например, цисплатин) вводят одновременно на день 1 и день 8 из 21-дневного цикла.

Доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, находится предпочтительно в интервале от 250 до 1250 мг/м². Доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, может находиться в интервале от 300 до 1000 мг/м². Доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, может находиться в интервале от 400 до 900 мг/м², например от 600 до 800 мг/м² или от 300 до 750 мг/м². Доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, может составлять приблизительно 750 мг/м².

Доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин), вводимая при каждом введении, может составлять от 10 до 200 мг/м². Доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин), вводимая при каждом введении может составлять от 20 до 100 мг/м². Доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин), вводимая при каждом введении, может составлять от 20 до 60 мг/м². Доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин), вводимая при каждом введении, может составлять от 30 до 90 мг/м².

Возможно, что доза NUC-1031, или доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин), или доза обоих соединений остается в основном одинаковой в каждом цикле лечения. Например, доза NUC-1031, составляющая приблизительно 750 мг/м², при введении и доза цисплатина, составляющая приблизительно 50 мг/м², могут использоваться в нескольких циклах лечения.

Альтернативно, возможно, что доза NUC-1031, или доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин), или доза обоих соединений уменьшается от первого цикла лечения к второму (или последующему) циклу лечения. Например, доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, может уменьшаться от приблизительно 750 мг/м² в первом цикле лечения до приблизительно 625

мг/м² во втором (или последующем) цикле лечения. Доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин) может уменьшаться от приблизительно 90 мг/м² в первом цикле лечения до приблизительно 60 мг/м² или до приблизительно 50 мг/м² во втором (или последующем) цикле лечения.

В соответствующих режимах лечения можно использовать уменьшение (как изложено в предыдущем абзаце) как дозы NUC-1031, так и дозы противоракового средства на основе платины (например, цисплатина) от первого цикла лечения ко второму (или последующему) циклу лечения. Например, доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, может уменьшаться от приблизительно 750 мг/м² в первом цикле лечения до приблизительно 625 мг/м² во втором (или последующем) цикле лечения, и доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин) может уменьшаться от приблизительно 90 мг/м² в первом цикле лечения до приблизительно 60 мг/м² или до приблизительно 50 мг/м² во втором (или последующем) цикле лечения.

В случае, если доза NUC-1031 уменьшается от первого ко второму или последующему циклу лечения (такой как от приблизительно 750 мг/м² за введения до приблизительно 625 мг/м² за введение), доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин) может остаться такой же между первым и вторым или последующим циклами лечения (например, приблизительно 50 мг/м² в каждом цикле).

В случае, если доза NUC-1031 остается постоянной от первого ко второму или последующему циклу лечения (такой как приблизительно 625 мг/м² за введение), доза противоракового средства на основе платины (например, цисплатин) может уменьшаться между первым и вторым или последующим циклом лечения (например, от 90 мг/м² в первом цикле лечения до приблизительно 60 мг/м² или до приблизительно 50 мг/м² во втором или последующем цикле лечения).

Ожидается, что приведенный выше режим дозировки обеспечивает баланс, в котором токсичность каждого из компонентов комбинации находится на приемлемом уровне, при этом сохраняя терапевтический положительный эффект, оказываемый комбинацией.

Возможно, что приведенный выше режим дозировки обеспечивает улучшенное выживание у пациентов. Возможно он обеспечивает стабильное заболевание у более чем 50% пациентов. Возможно он обеспечивает одно или несколько из вышеуказанных преимуществ с приемлемым уровнем побочных эффектов. Возможно, что дозировка такова, что AUC dFdCTP выше для комбинации, чем для NUC-1031, который вводят как единственное средство. Возможно, что дозировка такова, что соотношение AUC к C_{max} dFdCTP выше для комбинации, чем для NUC-1031, который вводят как единственное средство.

Краткое описание фигур

Варианты осуществления по изобретению дополнительно описаны со ссылками на фигуры.

На фиг. 1 показана хроматография для разделения соединений 3 и 4 с помощью ВЭЖХ с использованием колонны Chiralpak AD и системы градиентных растворителей n-гептан/IPA.

На фиг. 2 показан синергетический эффект, достигаемый с использованием метода сдвига кривой для цисплатина/NUC-1031 на клеточной линии рака мочевого пузыря HT1376.

Раскрытие изобретения

"Одновременное" означает "по существу, одновременное", например, менее чем за 30 мин.

"Последовательное" означает введение более чем за 30 мин друг от друга.

По всему описанию термин S-эпимер или S-диастереоизомер относится к гемцитабин-[фенилбензоксид-L-аланинил]-(S)-фосфату. Аналогично, по всему описанию термин R-эпимер или R-диастереоизомер относится к гемцитабин-[фенилбензоксид-L-аланинил]-(R)-фосфату.

Соединения в составах согласно изобретению могут быть получены, сохранены и/или введены в виде фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли фармацевтически приемлемых неорганических кислот, таких как хлористоводородная, серная, фосфорная, азотная, угольная, борная, аминосульфоновая и бромистоводородная кислоты, или соли фармацевтически приемлемых органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, масляная, винная, малеиновая, гидроксималеиновая, фумаровая, яблочная, лимонная, молочная, слизевая, глюконовая, бензойная, янтарная, щавелевая, фенилуксусная, метансульфоновая, толуолсульфоновая, бензолсульфоновая, салициловая, сульфаниловая, аспарагиновая, глутаминовая, этилендиаминтетрауксусная, стеариновая, пальмитиновая, олеиновая, лауриновая, пантотеновая, таниновая, аскорбиновая и валериановая кислоты. Подходящие соли оснований образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамин и цинка. Полусоли кислот и оснований могут также быть образованы, например, полусульфатные, полуоксалатные и полукальциевые соли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, особенно таких, которые используют S-эпимер, соединение представлено в виде HCl-соли или полуоксалатной соли.

Соединения по изобретению могут существовать в монокристаллической форме или в смеси кристаллических форм, или они могут быть аморфными. Таким образом, соединения по изобретению, предназначенные для фармацевтического применения, можно вводить как кристаллическими или аморфными. Они могут быть получены, например, в виде твердых частиц, порошков или пленок, способами, такими как осаждение, кристаллизация, сушка вымораживанием, или распылительная сушка, или испари-

тельная сушка. Для этой цели можно использовать микроволновую или радиочастотную сушку.

Для вышеупомянутых соединений по изобретению вводимая доза будет, разумеется, варьироваться в зависимости от используемого соединения, способа введения, желаемого лечения и указанного устройства. Например, если соединение по изобретению вводится парентерально, то дозировка соединения по изобретению может находиться в диапазоне от 0,1 до 5 г/м², например от 0,5 до 2 г/м². Размер дозы для терапевтических целей соединений по изобретению будет, естественно, изменяться в зависимости от характера и тяжести условий, возраста и пола животного или пациента и способа введения в соответствии с хорошо известными принципами медицины.

Ожидается, что уровни дозировки, частота дозы и продолжительность лечения соединений по изобретению будут различаться в зависимости от формы состава и клинического показания, возраста и сопутствующих заболеваний пациента.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемая соль могут быть использованы сами по себе, но обычно его можно вводить в форме фармацевтической композиции, в которой соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли ассоциированы с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем. Обычные методики выбора и получения подходящих фармацевтических композиций описаны, например "Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs", M.E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988.

В зависимости от способа введения соединений по изобретению фармацевтическая композиция, которая используется для введения соединений по изобретению, предпочтительно включает от 0,05 до 99 мас.% (процент по массе) соединения по изобретению, более предпочтительно от 0,05 до 80 мас.% соединения по изобретению, еще более предпочтительно от 0,10 до 70 мас.% соединения по изобретению и даже более предпочтительно от 0,10 до 50 мас.% соединения по изобретению, все массовые концентрации указаны в процентах из расчета по общей массе композиции.

Для перорального введения соединения по изобретению могут быть смешаны с адъювантом или носителем, например лактозой, сахарозой, сорбитом, маннитом; крахмалом, например картофельным крахмалом, кукурузным крахмалом или амилопектином; производным целлюлозы; связующим веществом, например желатином или поливинилпирролидоном; и/или смазывающим веществом, например стеаратом магния, стеаратом кальция, полиэтиленгликолем, воском, парафином и т.п., и затем могут быть прессованы в таблетки. Если требуется получить покрытые оболочкой таблетки, сердцевинки, приготовленные, как описано выше, могут быть покрыты концентрированным раствором глюкозы, который может включать, например, аравийскую камедь, желатин, тальк и двуокись титана. Альтернативно, таблетка может быть покрыта подходящим полимером, растворенным в легко улетучиваемом органическом растворителе.

Для получения мягких желатиновых капсул активное соединение может быть смешано, например, с растительным маслом или полиэтиленгликолем. Твердые желатиновые капсулы могут содержать гранулы соединения с использованием любого из описанных выше эксципиентов для таблеток. Кроме того, жидкие или полутвердые составы, содержащие активные соединения, могут быть заключены в твердые желатиновые капсулы.

Жидкие препараты для перорального применения могут быть в виде сиропов или суспензий, например растворов, содержащих соединение согласно изобретению, равновесие в которых устанавливается добавлением сахара и смеси этанола, воды, глицерина и пропиленгликоля. Необязательно такие жидкие препараты могут содержать красители, ароматизаторы, подсластители (такие как сахарин), консерванты и/или карбоксиметилцеллюлозу в качестве загустителя или другие эксципиенты, известные специалистам в данной области техники.

Для парентерального (например, внутривенного) введения соединения можно вводить в виде стерильного водного или масляного раствора. Соединения по изобретению являются очень липофильными. Таким образом, водные составы, как правило, также содержат фармацевтически приемлемый полярный органический растворитель.

Размер дозы для терапевтических целей соединений по изобретению будет, естественно, изменяться в зависимости от характера и тяжести условий, возраста и пола животного или пациента и способа введения в соответствии с хорошо известными принципами медицины.

Ожидается, что уровни дозировки, частота дозы и продолжительность лечения соединениями по изобретению будут различаться в зависимости от состава и клинического показания, возраста и сопутствующих заболеваний пациента.

Настоящее изобретение также включает все фармацевтически приемлемые изотопно-меченные формы соединений 2, 3 или 4, где один или более атомов заменены атомами, имеющими одинаковый атомный номер, но атомная масса или массовое число которых отличаются от атомной массы или массового числа преобладающего изотопа, обычно встречаемого в природе.

Примеры изотопов, подходящих для включения в соединения согласно изобретению, включают изотопы водорода, такие как ²H и ³H, углерода, такие как ¹¹C, ¹³C и ¹⁴C, хлора, такие как ³⁶Cl, фтора, такие как ¹⁸F, йода, такие как ¹²³I и ¹²⁵I, азота, такие как ¹³N и ¹⁵N, кислорода, такие как ¹⁵O, ¹⁷O и ¹⁸O, фосфора, такие как ³²P, и серы, такие как ³⁵S.

Некоторые конкретные изотопно-меченные соединения, например, такие, которые включают радиоактивный изотоп, являются пригодными в лекарственных средствах и/или в исследованиях распределения субстрата в тканях. Радиоактивный изотоп водорода тритий, т.е. ^3H , и углерода-14, т.е. ^{14}C , являются наиболее пригодными изотопами для этой цели, исходя из легкости их включения и доступных средств определения.

Замена более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т.е. ^2H , может привести к определенным терапевтическим преимуществам, возникающим в результате более высокой метаболической устойчивости, например повышения времени полужизни *in vivo* или снижения требований к дозировке, и, следовательно, может быть предпочтительной в некоторых обстоятельствах.

Замещение изотопами, излучающими позитрон, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может применяться в исследованиях топографии позитронной эмиссии (PET) для изучения активности рецептора субстрата.

Изотопно-меченные соединения обычно могут быть получены обычными способами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными описанным с использованием соответствующего меченного изотопами реагента вместо ранее использованного немеченного реагента.

Способ лечения или соединения для применения в лечении рака может включать в дополнение к гемцитабину-[фенил-бензокси-L-аланинил)]фосфату и противоракового соединения на основе рака обычные методы хирургии или лучевой терапии или химиотерапии. Такая химиотерапия может включать введение одного или нескольких других активных агентов.

Таким образом, фармацевтические составы согласно изобретению могут включать другое активное средство.

Одно или более других активных средств могут представлять собой одно или более из следующих категорий противоопухолевых средств:

(i) антипролиферативные/антинеопластические лекарственные средства и их комбинации, такие как алкилирующие средства (например, циклофосфамид, азотистый иприт, бендамустин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, темозоломид и нитрозомочевина); антиметаболиты (например, гемцитабин и антифолаты, такие как фторпиримидины, подобные 5-фторурацилу и тегафуру, ралтитрексид, метотрексат, пеметрексед, цитозина арабинозид и гидроксимочевина); антимитотические агенты (например, алкалоиды барвинка, подобные винкристину, винбластину, виндезину и винорелбину, и таксоиды, подобные таксолу и таксотеру, и ингибиторы полокиназы); протеасомные ингибиторы, например карфилзомиб и бортезомиб; терапия интерфероном; и ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, подобные этопозиду и тенипозиду, амсакрин, топотекан, митоксантрон и камптотецин);

(ii) цитостатические средства, такие как антиэстрогены (например, тамоксифен, фулвестрант, торемифен, ралоксифен, дролоксифен и йодоксифен), антиандрогены (например, бикалутамид, флутамид, нилутамид и ципротерона ацетат), антагонисты LHRH или агонисты LHRH (например, гозерелин, лейп-порелин и бусерелин), прогестогены (например, мегестрола ацетат), ингибиторы ароматазы (например, такие как анастрозол, летрозол, воразол и экземестан) и ингибиторы 5α -редуктазы, такие как финастерид;

(iii) средства против инвазии, например дазатиниб и босутиниб (SKI-606), и ингибиторы металло-протеиназ, ингибиторы функции рецепторов активатора плазминогена урокиназного типа или антитела к гепараназе;

(iv) ингибиторы функции фактора роста: например, такие ингибиторы включают антитела к фактору роста и антитела к рецептору фактора роста, например анти-erbB2 антитело трастузумаб [герцептинTM], анти-EGFR антитело панитумумаб, анти-erbB1 антитело цетуксимаб, ингибиторы тирозинкиназы, например ингибиторы семейства рецепторов эпидермального фактора роста (например, ингибиторы семейства EGFR с тирозинкиназной активностью, такие как gefitinib, эрлотиниб и 6-акриламидо-N-(3-хлор-4-фторфенил)-7-(3-морфолинопропокси)хиназолин-4-амин (CI 1033), ингибиторы erbB2 тирозинкиназы, такие как лапатиниб); ингибиторы семейства факторов роста гепатоцитов; ингибиторы семейства факторов роста инсулина; модуляторы белков-регуляторов клеточного апоптоза (например, ингибиторы Bcl-2); ингибиторы семейства факторов роста тромбоцитов, такие как иматиниб и/или нилотиниб (AMN107); ингибиторы серин/треонин протеинкиназ (например, ингибиторы сигнального пути по Ras/Raf-каскаду, такие как ингибиторы фarnезилтрансферазы, например сорафениб, типифарниб и лонафарниб), ингибиторы системы клеточных сигналов через MEK и/или AKT киназы, ингибиторы c-kit, ингибиторы abl-киназы, ингибиторы PI3-киназы, ингибиторы PI3-киназы, ингибиторы CSF-1R киназы, рецептор IGF, ингибиторы киназ; ингибиторы киназы Аврора и ингибиторы циклинзависимой киназы, такие как ингибиторы CDK2 и/или CDK4;

(v) антиангиогенные средства, такие как средства, которые ингибируют действие фактора роста эндотелия сосудов, [например, антитело против фактора роста эндотелия сосудов бевацизумаб (авастинTM); талидомид; леналидомид; и, например, ингибитор рецептора VEGF с тирозинкиназной активностью, такой как вандетаниб, ваталаниб, сунитиниб, акситиниб и пазопаниб;

(vi) методы генной терапии, включающие, например, методы замены аномальных генов, таких как p53 или аномальный ген BRCA1 или BRCA2;

(vii) методы иммунотерапии, включающие, например, терапию антителами, такими как алемтузумаб, ритуксимаб, ибритумомаб тиуксетан (зевалин®) и офтатумумаб; интерфероны, такие как интерферон α ; интерлейкины, такие как IL-2 (альдеслейкин); ингибиторы интерлейкина, например ингибиторы IRAK4; противораковые вакцины, включающие вакцины для профилактики и лечения, такие как вакцины против HPV, например гардасил, церварикс, онкофаг и сипулейцел-Т (Provenge); и модуляторы толл-подобного рецептора, например агонисты TLR-7 или TLR-9; и

(viii) цитотоксические средства, например флударабин (флудара), кладрибин, пентостатин (Nipent™);

(ix) стероиды, такие как кортикостероиды, включающие глюкокортикоиды и минералокортикоиды, например аклометазон, аклометазона дипропионат, альдостерон, амцинонид, беклометазон, беклометазона дипропионат, бетаметазон, бетаметазона дипропионат, бетаметазона натрия фосфат, бетаметазона валерат, будесонид, клобетазон, клобетазона бутират, клобетазона пропионат, клопреднол, кортизон, кортизона ацетат, кортивазол, дезоксикортон, десонид, дезоксиметазон, дексаметазон, дексаметазона натрия фосфат, дексаметазона изоникотинат, дифторкортолон, флуклоролон, флуметазон, флунизол, флуоцинолон, флуоцинолона ацетонид, флуоцинонид, флуокортина бутил, флуорокортизон, флуорокортолон, флуорокортолона капроат, флуорокортолона пивалат, флуорометолон, флупредниден, флупреднидена ацетат, флурандренолон, флутиказон, флутиказона пропионат, галцинонид, гидрокортизон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизона бутират, гидрокортизона ацепонат, гидрокортизона бутеprat, гидрокортизона валерат, икометазон, икометазона энбутат, мепреднизон, метилпреднизолон, мометазон, параметазон, мометазона фууроата моногидрат, предникарбат, преднизон, преднизолон, тиксокортол, тиксокортола пивалат, триамцинолон, триамцинолона ацетонид, триамцинолоновый спирт и их соответствующие фармацевтически приемлемые производные. Можно использовать комбинацию стероидов, например, комбинацию двух или более стероидов, описанных в этом абзаце;

(x) направленная терапия, например, ингибиторами PI3Kd, например иделагисибом и перифозином; или соединениями, которые ингибируют PD-1, PD-L1 и CAR T.

Одним или несколькими другими активными средствами могут быть также антибиотики (например, антрациклины, такие как адриамицин, блеомицин, доксорубин, дауномицин, эпирубин, идарубин, митомицин-С, дактиномицин и митрамицин).

Везде в описании и формуле изобретения слова "включают" и "содержат" и их варианты означают "включая, но не ограничиваясь ими", и они не предназначены (и не) исключают другие фрагменты, добавки, компоненты, целые числа или стадии. Везде в описании и формуле изобретения единственное число охватывает и множественное число, если контекст не требует иного. В частности, где указан неопределенный артикль, должно быть понятно, что может подразумеваться и множественная форма, если контекст не требует иначе.

Признаки, целые числа, характеристики, соединения, химические фрагменты или группы, приведенные в сочетании с конкретным аспектом, вариантом осуществления или примером изобретения, следует понимать применимыми к любому другому аспекту, варианту осуществления или примеру, описанному здесь, если они совместимы с ним. Все признаки, раскрытые в этом описании (включая приложенные формулы изобретения, реферат и фигуры) и/или все стадии любого способа или метода, раскрытого здесь, могут сочетаться в любой комбинации, кроме комбинаций, где, по меньшей мере, некоторые из таких признаков и/или стадий взаимно исключают друг друга. Изобретение не ограничивается параметрами вышеприведенных вариантов осуществления. Изобретение распространяется на любое новое изобретение или любую новую комбинацию признаков, раскрытых в этом описании (включая приложенную формулу изобретения, реферат и чертежи), или на любое новое изобретение или любую новую комбинацию стадий любого способа или процесса, раскрытых здесь таким образом.

Также следует учесть, что все документы и бумаги, которые подаются одновременно с этим описанием или ранее перед в связи с этой заявкой и которые открыты для публичного ознакомления с этим описанием, а содержание всех таких документов и бумаг включено сюда в полном объеме посредством указания ссылки на них.

Пример 1. Выделение диастереоизомеров NUC-1031.

(R)- и (S)-изомеры разделяли посредством ВЭЖХ в следующих условиях:

оборудование: хроматографы серии Agilent 1200™ с детектором DAD,

скорость потока: 1,0 мл/мин,

колонок: Chiralpak AD™ 250×4,6 мм ID (нормальная фаза),

температура: температура окружающей среды,

размер частицы: 20 мкм,

подаваемый материал: растворенный в MeOH; 10 г/л,

растворитель: н-гептан/ИПС 10 - >50% ИПС.

Хроматограмма показана на фиг. 1. (S)-эпимер элюируется за 8,6 мин, и (R)-эпимер элюируется за 10,3 мин.

Методы и материалы для характеристики: протонный (^1H), углеродный (^{13}C), фосфорный (^{31}P) и

фторный (^{19}F) спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance 500 при 25°C.

Спектры автоматически калибровали по пику дейтерированного растворителя, и все спектры ^{13}C ЯМР и ^{31}P ЯМР показали подавление спин-спинового взаимодействия с протонами. Было показано, что чистота конечных соединений составляет >95%, исходя из анализа ВЭЖХ с использованием Varian Polarar C18-A (10 мкм) в качестве аналитической колонки с градиентом элюирования $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ от 100/0 до 0/100 за 35 мин. Анализ ВЭЖХ проводили с помощью жидкостного хроматографа Varian Prostar (LC Workstation-Varian prostar 335, детектор LC).

2'-Дезокси-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-О-[фенил-(бензилокси-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3.

(ES+) m/z, найдено: $(\text{M}+\text{Na}^+)$ 603,14. $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{NaP}$ рассчитано: (M^+) 580,47.

^{31}P ЯМР (202 МГц, MeOD): δ_{P} 3,66.

^1H ЯМР (500 МГц, MeOD): δ_{H} 7,58 (д, $J=7,5$ Гц, 1H, H-6), 7,38-7,32 (м, 7H, ArH), 7,26-7,20 (м, 3H, ArH), 6,24 (т, $J=7,5$ Гц, 1H, H-1'), 5,84 (д, $J=7,5$ Гц, 1H, H-5), 5,20 (AB система, $J_{\text{ab}}=12,0$ Гц, 2H, OCH_2Ph), 4,46-4,43 (м, 1H, H-5'), 4,36-4,31 (м, 1H, H-5'), 4,25-4,19 (м, 1H, H-3'), 4,07-4,00 (м, 2H, H-4', CHCH_3), 1,38 (д, $J=7,2$ Гц, 3H, CHCH_3).

^{19}F ЯМР (470 МГц, MeOD): δ_{F} - 118,0 (д, $J=241$ Гц, F), 120,24 (уш.д, $J=241$ Гц, F).

^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD): δ_{C} 174,61 (д, $^3J_{\text{C-P}}=5,0$ Гц, C=O, сложный эфир), 167,63 (C-NH₂), 157,74 (C=O основание), 152,10 (д, $^2J_{\text{C-P}}=7,0$ Гц, C-Ar), 142,40 (CH-основание), 137,22 (C-Ar), 130,90, 129,63, 129,39, 129,32, 126,32 (CH-Ar), 124,51 (д, $^1J_{\text{C-F}}=257$ Гц, CF_2), 121,47, 121,43 (CH-Ar), 96,67 (CH-основание), 85,92 (уш. сигнал, C-1'), 80,31 (C-4'), 71,27 (кажущийся т, $^2J_{\text{C-F}}=23,7$ Гц, C-3'), 68,03 (OCH_2Ph), 65,73 (д, $^2J_{\text{C-P}}=5,30$ Гц, C-5'), 51,66 (CHCH_3), 20,42 (д, $^3J_{\text{C-P}}=6,25$ Гц, CHCH_3).

ВЭЖХ с обращенной фазой, элюирование $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ от 100/0 до 0/100 в течение 35 мин, показан один пик диастереоизомера с $t_{\text{R}}=22,53$ мин.

2'-Дезокси-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-О-[фенил-(бензилокси-L-аланинил)]-(R)-фосфат 4.

(ES+) m/z, найдено: $(\text{M}+\text{Na}^+)$ 603,14. $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{NaP}$ рассчитано: (M^+) 580,47.

^{31}P ЯМР (202 МГц, MeOD): δ_{P} 3,83.

^1H ЯМР (500 МГц, MeOD): δ_{H} 7,56 (д, $J=7,5$ Гц, 1H, H-6), 7,38-7,31 (м, 7H, ArH), 7,23-7,19 (м, 3H, ArH), 6,26 (т, $J=7,5$ Гц, 1H, H-1'), 5,88 (д, $J=7,5$ Гц, 1H, H-5), 5,20 (с, 2H, OCH_2Ph), 4,49-4,46 (м, 1H, H-5'), 4,38-4,34 (м, 1H, H-5'), 4,23-4,17 (м, 1H, H-3'), 4,07-4,01 (м, 2H, H-4', CHCH_3), 1,38 (д, $J=7,2$ Гц, 3H, CHCH_3).

^{19}F ЯМР (470 МГц, MeOD): δ_{F} - 118,3 (д, $J=241$ Гц, F), -120,38 (уш.д, $J=241$ Гц, F).

^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD): δ_{C} 174,65 (д, $^3J_{\text{C-P}}=5,0$ Гц, C=O, сложный эфир), 167,65 (C-NH₂), 157,75 (C=O основание), 152,10 (д, $^2J_{\text{C-P}}=7,0$ Гц, C-Ar), 142,28 (CH-основание), 137,50 (C-Ar), 130,86, 129,63, 129,40, 129,32, 126,31 (CH-Ar), 124,50 (д, $^1J_{\text{C-F}}=257$ Гц, CF_2), 121,44, 121,40 (CH-Ar), 96,67 (CH-основание), 85,90 (уш. сигнал, C-1'), 80,27 (C-4'), 71,30 (кажущийся т, $^2J_{\text{C-F}}=23,7$ Гц, C-3'), 68,02 (OCH_2Ph), 65,50 (C-5'), 51,83 (CHCH_3), 20,22 (д, $^3J_{\text{C-P}}=7,5$ Гц, CHCH_3).

ВЭЖХ с обращенной фазой, элюирование $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ от 100/0 до 0/100 в течение 35 мин, показан один пик диастереоизомера с $t_{\text{R}}=21,87$ мин.

Пример 2. Исследование комбинации NUC-1031 и цисплатина In vitro.

2.1. Материалы и методы.

Клеточные культуры и реагенты.

A2780, SK-OV-3, OVCAR-3, NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H2122, 5637 и HT1376 культивировали в среде RPMI 1640 (Invitrogen-22400105), добавляли 10% фетальную телячью сыворотку (FBS; Invitrogen-10099141). Все клеточные линии выдерживали в термостате с поддержанием требуемой влажности при 37°C под 5% CO_2 . Клеточные культуральные среды и добавки были приобретены у Invitrogen, а колбы для тканевой культуры были приобретены у Corning, 96-луночные планшеты и 384-луночные планшеты были приобретены у Greiner. Комплекты для оценки жизнеспособности клеток CellTiter-Glo были приобретены у Promega (Promega-G7573), счетчик клеток Vi-Cell был приобретен у Beckman, прибор для детектирования Envision был приобретен у PerkinElmer.

Паклитаксел (используемый в качестве эталона) и цисплатин были приобретены у SELLECK, и они имели самую высокую степень чистоты. Все соединения растворяли в ДМСО и далее разводили в культуральной среде. ДМСО, растворы соединений и культуральные среды нагревали до 37°C для получения раствора и разбавлений.

Исследование цитотоксичности.

Восемь клеточных линий выдерживали в 96-луночных планшетах в течение ночи (100 мкл/лунка); для лекарственной терапии смешанные исходные растворы готовили в ДМСО и добавляли в лунки с 3,16-кратными разведениями, по 9 точек на дозу, или в трех повторах, с получения указанных конечных концентраций лекарственного средства, или с контролем по носителю. Конечная концентрация ДМСО составляла 0,5%. Клеточные концентрации АТР оценивали через 72 ч после добавления состава с использованием анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo в соответствии с инструкциями изготовителя.

Исследование комбинаций.

8 клеточных линий выдерживали в 384-луночных планшетах в течение ночи (60 мкл/лунка); для исследования комбинаций четыре комбинации двух соединений исследовали в двух повторах, сохраняя фиксированную концентрацию одного соединения, одновременно увеличивая концентрацию второго соединения (10-кратное разведение, по 5 точек на дозу), исходные растворы соединения готовили в диметилсульфоксиде и добавляли в лунки с помощью цифрового диспенсера D300e, получая указанные конечные концентрации лекарственного вещества. Конечная концентрация диметилсульфоксида составляла 0,5%.

Клеточные концентрации АТФ оценивали через 72 ч после добавления состава с использованием анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo в соответствии с инструкциями изготовителя.

Таким образом, исследование включало две стадии.

Стадия 1. Исследование IC₅₀ для отдельных составов.

На стадии 1 определяли IC₅₀ (используя 5 или более концентраций) каждого индивидуального соединения (цисплатин, гемцитабин и NUC-1031) в релевантных клеточных линиях.

Таблица 1

Верхняя концентрация отдельных агентов, разведенных в 3,16 раза в 9 точках и проверенная в трех повторах

Верхняя концентрация (мкМ)		Гемцитабин	NUC-1031	Паклитаксел
Наименование клеток	Цисплатин			
A2780	198	1,98	1,98	1,98
SK-OV-3	198	1,98	1,98	1,98
OVCAR-3	198	1,98	1,98	1,98
NCI-H460	198	1,98	1,98	1,98
NCI-H1975	198	1,98	1,98	1,98
5673	198	1,98	1,98	1,98
HT1376	198	1,98	1,98	1,98

Стадия 2. Комбинированное лечение.

В стадии 2 определяли взаимодействие выбранных комбинаций соединений на рост раковых клеток. Всего исследовали 8 параметров на релевантных клеточных линиях. Это означает, что четыре комбинации двух соединений исследовали в двух повторах, сохраняя фиксированную концентрацию одного соединения с увеличением концентрации второго соединения.

Таблица 2

Комбинированный план лечения, выполненный в четырех повторах в 9 точках с 10-кратным разбавлением

Тип опухоли	Характеристики клеточной линии	Клеточная линия	Гемцитабин+цисплатин	NUC-1031+цисплатин
Яичник	Линия, чувствительная к платине Средняя чувствительность к платине Умеренная резистентность к цисплатину	A2780	X	X
Яичник		SK-OV3	X	X
Яичник		OVCAR-3	X	X
NSCLC	Линия, чувствительная к платине Средняя чувствительность к платине	NCI-460	X	X
NSCLC		NCI-1975	X	X
Мочевой пузырь	Чувствительная к цисплатину Средняя чувствительность к цисплатину	5637	X	X
Мочевой пузырь		HT-1376	X	X

2.2. Аналитические способы.

Для характеристики эффекта комбинаций соединений будет использована следующая терминология.

"Синергия" определена как более сильный наблюдаемый эффект от комбинации соединений, чем предсказано по эффектам отдельных соединений.

"Аддитивный" эффект определен как наблюдаемый эффект комбинации соединений равен предсказанному от суммы эффектов отдельных соединений.

"Антагонизм" определен как значительно более слабый эффект от комбинации соединений, чем предсказанный эффект от отдельных соединений.

Метод Чоу-Талалая.

Метод Чоу-Талалая для комбинации лекарственных веществ основан на уравнении медиана-эффект, получаемого из закона действующих масс, где полученный индекс комбинации (CI) по теории Чоу-Талалая предлагает количественное определение показателя для аддитивного эффекта (CI=1), синергизма (CI <1) в комбинациях лекарственных веществ.

Модель по Влиссу.

Метод сравнивает наблюдаемый комбинированный ответ (YO) с предсказанным комбинированным ответом (YP), который был получен на основании предположения о том, что никакого эффекта от взаимодействия лекарственного средства не происходит.

Считается, что два лекарственных средства А и В ингибируют рост опухоли: лекарственное средство А в дозе а ингибирует рост опухоли на Y^a процентов, а лекарственное средство В в дозе b ингибирует рост опухоли на Y^b процентов. Если два лекарственных средства действуют независимо, комбинированное ингибирование, выраженное в процентах, Y^{ab} , Р можно предсказать, используя полную аддитивность по теории вероятности как Y^{ab} , $P=Y^a+Y^b-Y^aY^b$.

Анализ по методу сдвига кривой.

Считается, что два лекарственных средства действуют независимо; для лекарственного средства А сохраняют фиксированную концентрацию и изменяют концентрацию лекарственного средства В, нормализуя эффект комбинации по фиксированной концентрации А, сравнивают кривые эффекта дозы, полученные от лекарственного средства В: сдвиг влево комбинированных кривых доза-эффект относится к синергии, сдвиг вправо указывает на антагонизм, а перекрывание указывает на аддитивный эффект.

2.3. Результаты.

Стадия 1: анализ цитотоксичности отдельных агентов.

На стадии 1 оценивали цитотоксичность агентов по отдельности; цисплатин, NUC-1031 и гемцитабин исследовали, чтобы получить наиболее приемлемые концентрации для комбинированного действия на стадии 2.

Таблица 3

Обобщенные результаты в отношении абсолютной IC₅₀, относительной IC₅₀ и максимального ингибирования при лечении агентами по отдельности в соответствующих линиях раковых клеток

N o	Клеточная линия	Анализ СТГ								
		Цисплатин			Гемцитабин			NUC-1031		
		Абсолютн. IC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)	Макс. ингиб. %	Абсолютн. IC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)	Макс. ингиб. %	Абсолютн. IC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)	Макс. ингиб. %
1	A2780	10,96	10,07	99,05	0,01	0,01	81,15	0,025	0,016	79,15
2	SK-OV3	45,61	33,73	86,42	0,02	0,02	65,74	0,07	0,06	61,59
3	OVCA8-3	28,32	23,46	79,59	>1,98	0,02	6,95	>1,98	0,20	11,76
4	NCI-H460	2,59	2,57	97,56	0,01	0,01	96,28	0,04	0,04	91,98
5	NCI-H1975	69,55	69,23	103,60	0,08	0,02	62,12	>1,98	0,37	37,91
6	5637	13,70	13,21	101,74	0,01	0,01	84,49	0,20	0,12	77,88
7	HT1376	20,51	18,36	71,90	>1,98	>1,98	9,60	>1,98	>1,98	-2,54

Обсуждение результатов. Обобщение результатов всех трех аналитических методов.

Ниже в табл. 4 приведены результаты анализов с использованием трех методов (Чоу-Талалая, по Блиссу и по сдвигу кривой) для характеристики эффекта комбинации соединений NUC-1031 и цисплатина.

Таблица 4

Результат 3 аналитических методов оценки эффекта комбинации соединений на рост раковых клеток

Клеточная	Фиксированная	Чоу-Талалая	Метод	По Блисссу	По сдвигу
линия	концентрация				кривой
A2780 (Яичник)	Ацеларин 0,025мкМ	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект
	Цисплатин 11 мкМ				
SK-OV3 (Яичник)	Ацеларин 0,072 мкМ	Неизмеримый	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект
	Цисплатин 45,6 мкМ				
OVCAR-3 (Яичник)	Ацеларин 1,98 мкМ	Неизмеримый	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект
	Цисплатин 28,3 мкМ				
NCI-H460 (Легкое)	Ацеларин 0,04 мкМ	Антагонизм	Антагонизм	Цисплатин 2,6 мкМ+ Ацеларин 0,0198 мкМ	Аддитивный эффект
	Цисплатин 2,6мкМ				
NCI-H1975 (Легкое)	Ацеларин 1,98мкМ	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект
	Цисплатин 70мкМ				
5637 (Мочевой пузырь)	Ацеларин 0,199 мкМ	Синергия	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Антагонизм
	Цисплатин 13,7 мкМ				
HT-1376 (Мочевой пузырь)	Ацеларин 1,98 мкМ	Синергия	Синергия	Синергия	Синергия
	Цисплатин 20,51 мкМ				

Соответствие результатов по всем трем аналитическим методам демонстрирует, что синергия наблюдается у двух комбинаций соединений в отношении раковой линии клеток HT1376, что показано в табл. 5.

Таблица 5

Синергетический эффект при лечении комбинациями, подтвержденный всеми тремя методами

Клеточная линия	Фиксированная концентрация	Эффект последовательной дозы
HT1376 (Мочевой пузырь)	Гемцитабин 1,98 мкМ	Цисплатин
HT1376 (Мочевой пузырь)	NUC-1031 1,98 мкМ	Цисплатин

Результаты от индивидуальных соединений и средств.

Данные, проанализированные с использованием методики Чоу-Талалая.

CI <1, предполагаемая синергия

CI для изменяемой комбинации: GemCis (Цис+Гем)				
Доза Цис	Доза Гем	Эффект	CI	Клеточная линия
198,0	0,007	0,8952	0,518	A2780
11,0	1,98	0,8525	0,528	A2780
11,0	0,198	0,7973	0,489	A2780
198,0	0,008	0,931	0,341	NQ-H460
19,8	0,008	0,7922	0,375	NQ-H460

198,0	0,08	0,7688	0,15028	NCI-H1975
19,8	0,08	0,6851	0,17708	NCI-H1975
1,98	0,08	0,6976	0,149	NCI-H1975
70,0	0,198	0,7231	0,33835	NCI-H1975
70,0	0,0198	0,4228	0,65284	NCI-H1975
19,8	0,012	0,7909	0,68758	5637
1,98	0,012	0,7836	0,20073	5637
0,198	0,012	0,7522	0,19804	5637
0,0198	0,012	0,7314	0,22947	5637
13,7	0,198	0,9446	0,31724	5637
13,7	0,0198	0,8726	0,33306	5637
198,0	1,98	0,7601	0,46232	HT1376
19,8	1,98	0,6007	0,59809	HT1376
20,51	1,98	0,6572	0,4459	HT1376
20,51	0,198	0,5269	0,3652	HT1376

CI для изменяемой комбинации: AceCis (Cис+Аце)					
Доза Цис	Доза Аце	Эффект	CI	Клеточная линия	
198,0	0,025	0,9004	0,505	A2780	
11,0	0,198	0,6605	0,642	A2780	
2,6	0,198	0,7749	0,595	NCI-H460	
198,0	1,98	0,8097	0,27205	NCI-H1975	
70,0	0,198	0,5335	0,65375	NCI-H1975	
198,0	0,199	0,9794	0,57158	5637	
1,98	0,199	0,8218	0,60206	5637	
0,198	0,199	0,7971	0,69873	5637	
0,0198	0,199	0,8019	0,66363	5637	
13,7	0,198	0,8715	0,56581	5637	
19,8	1,98	0,4966	0,27588	HT1376	
20,51	1,98	0,6016	0,22343	HT1376	
20,51	0,198	0,3899	0,36726	HT1376	
20,51	0,0198	0,274	0,49796	HT1376	
20,51	0,00198	0,2662	0,50941	HT1376	
20,51	1,98E-4	0,3175	0,44121	HT1376	

CI >1, предлагаемый антагонизм

CI для изменяемой комбинации: GemCis (Cис+Гем)					
Доза Цис	Доза Гем	Эффект	CI	Клеточная линия	
19,8	0,007	0,519	18,3616	A2780	
1,98	0,007	0,3904	302,897	A2780	

CI для изменяемой комбинации: AceCis (Cис+Аце)					
Доза Цис	Доза Аце	Эффект	CI	Клеточная линия	
11,0	0,00198	0,3049	2,22423	A2780	
1,98	0,04	0,3557	2,266	NCI-H460	
0,198	0,04	0,2166	4,306	NCI-H460	
2,6	0,0198	0,1942	6,145	NCI-H460	
2,6	0,00198	0,2357	2,665	NCI-H460	

Данные, проанализированные с использованием метода сдвига кривой.

Синергетический эффект, показанный ниже для клеточной линии рака мочевого пузыря HT1376, показан на фиг. 2.

	Gem (1,98 мкМ)+Цисплатин	Цисплатин	Ацеларин (1,98 мкМ)+Цисплатин	Цисплатин 2
IC ₅₀	30,30	64,45	36,27	57,98

Данные, проанализированные с использованием методики по Блисссу.

Клеточная линия	Фиксированная концентрация	Эффект последовательной дозы
Синергия		
HT1376	Гемцитабин 1,98мкМ	Цисплатин
HT1376	Цисплатин 20,51 мкМ	Гемцитабин
HT1376	NUC-1031 1,98мкМ	Цисплатин
HT1376	Цисплатин 20,51 мкМ	NUC-1031

Пример 3. Дополнительное исследование комбинации NUC-1031 и цисплатина *in vitro*.

Клеточная культура и реагенты.

Клетки SKOV3 приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Их культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде Gibco™ RPMI 1640+GlutaMAX™-I (Life Technologies; 61870-010) с 10% Gibco™ FBS (Life Technologies; 61870-010) и 1% Gibco™ Penicillin-Streptomycin (Life Technologies; 15140122), известной как полная среда, в колбе для культивирования клеток. Цисплатин приобретали у TEVA UK Limited (PL 00289/1146). Флувастанин и сульфорафан приобретали у компании Merck Millipore Corporation (номера по каталогу 344096 и 574215 соответственно). (S)-NUC-1031 предоставлен компанией NuCana® Ltd.

Клеточная культура и применение лекарственных веществ.

Клетки SKOV3 высевали в объеме 200 мкл из расчета в среднем 250 клеток на лунку в 60 лунок 96-луночных планшетов Costar® 3596, с крайними 36 лунками, заполненными 200 мкл PBS каждая. Клетки оставляли расти в полной среде в течение 48 ч перед добавлением других лекарственных веществ. Цисплатин, (S)-NUC-1031, флувастанин и сульфорафан по отдельности в полной среде с 10 различными концентрациями добавляли в средние 60 лунок (день 0). Каждую концентрацию загружали в шести повторях. Клетки подвергали воздействию соединений в течение 24 ч и соединения заменяли чистой полной средой. Эксперимент с флувастантином повторяли с 4-дневным воздействием вместо 24 ч. Планшеты фиксировали 50 мкл 25% раствором TCA при 4°C в течение 60 мин в день 4 после добавления лекарственных соединений для анализа с сульфородамино В (см. ниже).

Для комбинации двух агентов различные концентрации цисплатина и флувастанина и две фиксированные концентрации цисплатина в сочетании с различными концентрациями флувастанина высевали в 96-луночный планшет Costar® 3596 в трех повторностях в средние 60 лунок. Крайние 36 лунок заполняли по 200 мкл PBS в каждую (день 0). Клетки оставляли на 24 ч для воздействия лекарственных веществ, затем соединения удаляли и заменяли чистой полной средой в день 1. Эксперимент повторяли с цисплатином с сульфорафаном и цисплатином с (S)-NUC-1031, каждую концентрацию загружали в трех повторях. Планшеты фиксировали 50 мкл 25% раствором TCA при 4°C в течение 60 мин в день 4 для анализа с сульфородамино В (см. ниже).

Колориметрический анализ с сульфородамино В (SRB).

После добавления раствора TCA планшеты промывали 10 раз проточной водопроводной водой и оставляли сушиться в сушильном шкафу при 50°C. Затем клетки окрашивали 50 мкл раствора красителя SRB и краситель вымывали 1% ледяной уксусной кислотой 4 раза в течение 30 мин после добавления SRB. Затем планшеты сушили в печи. Краситель SRB растворяли в 150 мкл 10 мМ буферного раствора Трис в течение 60 мин на качалке. Планшеты считывали на ридере для микропланшетов Biohit BP800 (Biohit Healthcare) и измеряли оптическую плотность при 540 нм. Результаты исследований как агентов по отдельности, так и комбинаций, использовали для расчета лекарственных соединений с использованием программного обеспечения Prism Software (GraphPad), где IC₅₀ представляет собой концентрацию лекарственного вещества, которая вызывает 50% ингибирование. Что касается результатов по комбинации двух агентов, их использовали для расчета индекса комбинации (CI) соединений с использованием программного обеспечения CalcuSyn Software (Biosoft).

Результаты.

IC₅₀ для цисплатина и сульфорафана составили 2,436 и 7,002 мкМ соответственно. IC₅₀ для флува-

статины и NUC-1031 не смогли вычислить из-за отсутствия ингибирующих эффектов. Значения CI для цисплатины с флувастатином варьировались от 0,355 до 0,557, демонстрируя синергию. Значения CI для цисплатины с сульфорафом варьировались от 0,871 до 1,474, что свидетельствует об антагонизме. Значения CI для цисплатины с NUC-1031 при 0,1-0,5 мкМ и 1-2 мкМ на клетках SKOV3 составили от 0,871 до 0,957 и от 1,067 до 1,756 соответственно.

Заключение.

Синергическое ингибирование было установлено при низких концентрациях NUC-1031 (0,1-0,5 мкМ) с цисплатином на клетках SKOV3, что делает его более вероятным для клинического применения, поскольку более низкие концентрации лекарств обычно дают более низкую токсичность. Этот результат может служить основой для дальнейшего исследования точной оптимальной комбинированной дозы перед исследованием по эффективности и безопасности на пациентах. Персонализированное лечение путем оценки цитотоксичности и побочных эффектов комбинации у индивидуумов является оптимальным из-за различий в генетическом профиле и реакции на лекарственное средство, так что каждый пациент мог бы принимать лекарства в оптимальных дозах.

Пример 4. Фармакокинетический анализ концентраций dFdCTP из клинического исследования ABC-008 (NUC-1031 в сочетании с цисплатином) и сравнение с результатами клинического исследования ProGem1 (только NUC-1031).

Первоначальный фармакокинетический анализ проводили на образцах, полученных от первых трех пациентов в клиническом исследовании ABC-008.

Детальные сведения о пациентах.

Пациент 1: 71 год - метастатическая карцинома желчного тракта - начальная доза: 625 мг/м² (S)-NUC-1031+25 мг/м² цисплатина.

Пациент 2: 78 лет - метастатическая карцинома желчного тракта - начальная доза: 625 мг/м² (S)-NUC-1031+25 мг/м² цисплатина.

Пациент 3: 75 лет - метастатическая карцинома желчного тракта - начальная доза: 625 мг/м² (S)-NUC-1031+25 мг/м² цисплатина.

Как NUC-1031, так и цисплатин вводили в дни 1 и 8 в рамках 21-дневного цикла.

Приемлемую дозировку 625 мг/м² NUC-1031 готовили в шприце Luerlock. Такая дозировка была выбрана на основании роста и массы субъекта, используя расчет стандартной площади поверхности тела (BSA). В удлинительную трубку из полиэтилена заливали 1,5 мл промывочного раствора до подключения шприца, содержащего NUC-1031, к удлинительной трубке.

Удлинительную трубку подключали к устройству для венозного введения (CVAD), и NUC-1031 вводили со скоростью 20 мл/ч с помощью шприцевого насоса. После завершения инъекции шприц с NUC-1031 отсоединяли от удлинительной трубки и удлинительную трубку затем промывали дополнительным объемом промывочного раствора (3 мл).

Материалы и методы.

1. Материалы.

Эталонное соединение dFdCTP получали от Biorbyt, Великобритания. Lymphoprep - от STEMCELL Technologies Inc., Великобритания. Перхлорную кислоту (PCA), ацетат аммония (NH₄Ac) и аммиак получали от Sigma Aldrich, Великобритания. Воду марки LC-MS, метанол, ацетонитрил и муравьиную кислоту получали от Fisher Scientific, Великобритания.

2. Методы.

А. Подготовка крови и подготовка PBMC: 6 мл крови собирали с использованием гепаринизированной пробирки для сбора крови. После центрифугирования и отделения плазмы собирали лейкоцитарную пленку и переносили в новую пробирку, содержащую 3 мл Lymphoprep с градиентом плотности. После центрифугирования верхнюю поверхность раздела, содержащую слой PBMC, переносили в новую пробирку. После промывки фосфатным буферным раствором (PBS), PBMC ресуспендировали в 100 мкл PBS. Затем добавляли еще 100 мкл 0,8М PCA и смесь перемешивали на вортексе и центрифугировали, а затем 100 мкл супернатанта переносили в новую пробирку. Экстракты PCA хранили при -80°C до проведения анализа.

В. Экстракция образцов (PBMC): экстракты PCA буферировали в 50 мкл 1М NH₄Ac, затем нейтрализовали, используя 20 мкл 10% раствора аммиака. Наконец, затем добавляли 5 мкл раствора, содержащего внутренний стандарт 8-хлорАТФ и 5 мкл деионизированной воды. Экстракты переносили в пробирку для LC-MS и 10 мкл вводили в систему UPLC-MS/MS.

3. Хроматографические методы и исследование образцов.

Получали 10 мг/мл исходного раствора аналита и аликвоту замораживали при -80°C до применения. Аналит исследовали с использованием ультраэффективной жидкостной хроматографической системы (Accela UPLC, Thermo Scientific, UK), оснащенной колонкой Biobasic AX, 5 мкм, 50×2,1 мм (Thermo Electron Corporation, Murrieta, Калифорния, США) и подвижной фазы, состоящей из смеси 10 мМ NH₄Ac в ACN/H₂O (30:70 об./об.), pH 6,0 (A) и 1 мМ NH₄Ac в ACN/H₂O (30:70 об./об.), pH 10,5 (B). Использовали градиент подвижной фазы, включая буфер A=95% при 0-0,5 мин, от 95 до 0% в течение 1,25 мин, сохраняли 0% в течение 1,75 мин, от 0 до 95% в течение 0,1 мин, заканчивая 95% в течение 2,9 мин, все при

объемной скорости потока 500 мл/мин.

4. Масс-спектрометрический анализ.

Элюируемые исследуемые соединения детектировали с использованием трехступенчатой квадрупольной масс-спектрометрической системы Vantage (Thermo Scientific, UK), оснащенной источником электрораспыления ионов. Образцы анализировали в режимах контроля множественного реактивного контроля (MRM), контроля положительных (+ve) и отрицательных (-ve) ионов при напряжении распыления 3500 В и 3000 В соответственно. Азот использовался в качестве среды и вспомогательного газа при скорости потока 50 и 20 произвольных единиц соответственно. Аргон использовали в качестве газа для столкновения с давлением 1,5 мТорр.

Результаты.

Исходные результаты показаны в табл. 9 и 10.

Таблица 9

Сравнение средних РК параметров в исследованиях ProGem1 и ABC-008

Средние РК параметры в плазме (без нормализации) для NUC-1031		
	ProGem1 (n=67) (NUC-1031 единственный агент)	ABC-008 (n=3) как (NUC-1031 в комбинации с цисплатином)
Средняя C_{\max} (мкг/мл)	66,5	124,6
Медиана T_{\max} (ч)	0,5	0,5
Среднее значение AUC_{0-24} (мкг/мл·ч)	66,5	142,8
Среднее значение конечного периода $t_{1/2}$ (ч)	0,9	0,5
Средний клиренс (л/ч)	5,2	8,3

Таблица 10

Сравнение средних РК параметров в исследованиях ProGem1 и ABC-008

Средние внутриклеточные параметры РК (без нормализации) для dFdCTP		
	ProGem1 (n=67) (NUC-1031 единственный агент)	ABC-008 (n=3) как (NUC-1031 в комбинации с цисплатином)
Средняя C_{\max} (пмоль/миллион клеток)	391,8	350,4
Медиана T_{\max} (ч)	0,5	1
Среднее значение AUC_{0-24} (пмоль/миллион клеток)	1379,0	1130,0
Среднее значение конечного периода $t_{1/2}$ (ч)	5,7	20,6
Средний клиренс (л/ч)	0,2	0,3

Обсуждение.

РК параметры в плазме для NUC-1031 показали увеличение AUC в 2,1 раза и увеличение C_{\max} в 1,9 раза по сравнению с ProGem1 (фаза I первого исследования NUC-1031 на человеке). РК параметры в плазме для NUC-1031 также показали увеличение периода полужизни в 3,6 раза по сравнению с исследованием, где NUC-1031 был единственным средством.

Внутриклеточные параметры dFdCTP (активная противораковая группа) были схожи с ProGem1 с очевидным исключением более длительного значения $t_{1/2}$. Это более длительное значение $t_{1/2}$ может быть объяснено высокими уровнями внутриклеточного dFdCTP через 4 ч после отбора проб для анализа показателей РК. Синергия, наблюдаемая в уровнях dFdCTP после лечения NUC-1031 с цисплатином, имеет значительные потенциальные клинические значения, включая более широкое клиническое применение для лечения рака, в случаях, когда требуются высокие уровни dFdCTP в течение более длительного периода времени для блокирования роста опухоли и для лечения рецидивирующих раковых опухолей после применения одного агента.

Понятно, что увеличенный период полужизни dFdCTP, наблюдаемый при лечении с использованием комбинаций гемцитабин-[фенилбензоксил-L-аланинил]фосфата или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, с описанными здесь противораковыми агентами на основе платины, обеспечивает преимущества в лечении рака в ряде контекстов. Основным преимуществом является гибкость дозирования, которая дает увеличенный период полужизни. Например, такие медицинские применения позволяют обеспечить эффективные схемы лечения, в которых случаи лечения с использованием активных агентов являются менее частыми, чем те, что используются в настоящее время. Просто в качестве примера можно привести тот факт, что лечение по изобретению может быть осуществлено у пациента в течение одной суточной дозы лечения, и оно не требует многократного введения в течение дня. Подходящие слу-

чай лечения, например отдельные случаи лечения, могут потребовать лишь относительно быстрого введения активных агентов, а не длительного введения, например, путем инфузии. Гемцитабин-[фенил-бензоксил-L-аланинил]фосфат и противораковое средство на основе платины, с которым он должен использоваться, могут быть представлены (как в комбинации, так и по отдельности) в качестве лекарственного средства для однократного ежедневного введения пациенту. Медикаменты такого рода для однократного ежедневного введения могут быть полезны при лечении рецидивов рака.

Лечение в соответствии с изобретением с использованием гемцитабин-[фенил-бензоксил-L-аланинил]фосфата в комбинации с противораковым агентом на основе платины, независимо от того, в комбинации или последовательно, может использоваться в случаях лечения, осуществляемого каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждую неделю. Кроме того, лечение в соответствии с изобретением может быть использовано в случаях, если лечение разделено одной, двумя или тремя неделями друг от друга.

Пример 5. Сравнение ключевых временных точек, установленных для выживаемости без прогрессирования, полученных ранее в исследовании ABC-08, и связанные радиологические ответы с медианными временными точками, установленными для выживаемости без прогрессирования, в исследовании ABC-02 в комбинированной терапии с применением одного гемцитабина и гемцитабина/цисплатина.

Описание ABC-02.

В исследовании ABC-02 было установлено, что комбинация гемцитабин/цисплатин является превосходящим стандартом лечения по сравнению с одним только гемцитабином в условиях метастатического рака желчного тракта. Установленная медиана для выживаемости без прогрессирования для пациентов, получавших гемцитабин/цисплатин, составляла 8 месяцев. Установленная медиана для выживаемости без прогрессирования для пациентов, получавших гемцитабин в качестве терапии единственным агентом, составляла 5 месяцев (Valle J., Wasan H., Palmer D.H. et al. in 2010).

Сравнение с ABC 08.

Временные точки выживаемости без прогрессирования, полученные на сегодняшний день в исследовании ABC-08, превысили установленную медиану для терапии гемцитабином в качестве единственного агента, так и для терапии комбинацией гемцитабин/цисплатин. Конкретные примеры приведены ниже.

Пациент 02: имел 60%-ное снижение дозировки NUC-1031 до 375 мг/м² и сопутствующее 25%-ное снижение цисплатина. Однако, как более подробно показано ниже, объем опухоли в течение продолжительного времени продолжал постоянно снижаться.

Этот пациент достиг увеличения временной точки выживания в 9 месяцев, и этот процесс продолжается. Это самое длительное наблюдаемое увеличение временной точки выживания в исследовании ABC-08, и в настоящее время превышает медиану, установленную в исследовании ABC-02.

Этот же пациент показал подтвержденное многократными радиологическими исследованиями продолжающееся снижение объема опухоли:

контроль через 3 месяца: 17%-ное снижение опухоли, устойчивое заболевание,
контроль через 6 месяцев: 24%-ное снижение опухоли, устойчивое заболевание,
контроль через 9 месяцев: 41%-ное снижение опухоли, частичный ответ.

Пациент 05 - 55 лет - метастатическая карцинома желчных путей - первичная доза: 625 мг/м² (S)-NUC-1031 + 25 мг/м² цисплатина.

Этот пациент достиг увеличения временной точки выживания в 5,5 месяцев, и этот процесс продолжается, превысив медианную временную точку выживания в 5 месяцев, установленную для пациентов, получающих только гемцитабин.

Этот же пациент показал подтвержденное первым радиологическим исследованием значительное снижение объема опухоли:

контроль через 3 месяца: 54%-ное снижение, частичный ответ.

Хотя эти результаты получены от отдельных пациентов, они представляют собой многообещающие клинические результаты в отношении комбинации по изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата для лечения рака в комбинации с цисплатином, где рак выбран из рака мочевого пузыря или рака желчных путей.

2. Применение по п.1, где гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат представлен в форме свободного основания.

3. Применение по п.1 или 2, где гемцитабин-[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

4. Применение по любому из пп.1-3, где рак является рецидивирующим.

5. Применение по любому из пп.1-4, где рак является метастатическим.

6. Применение по любому из пп.1-5, где рак рефрактерный, резистентный или частично резистент-

ный к цисплатину.

7. Применение по любому из пп.1-6, где рак чувствителен к цисплатину.

8. Способ лечения рака, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в комбинации с цисплатином, где рак выбран из рака мочевого пузыря или рака желчных путей.

9. Способ по п.8, где гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат представлен в форме свободного основания.

10. Способ по п.8 или 9, где гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

11. Способ по любому из пп.8-10, где рак является рецидивирующим.

12. Способ по любому из пп.8-11, где рак является метастатическим.

13. Способ по любому из пп.8-12, где рак рефрактерный, резистентный или частично резистентный к цисплатину.

14. Способ по любому из пп.8-13, где рак чувствителен к цисплатину.

15. Способ по любому из пп.8-14, где доза NUC-1031, которую вводят при каждом введении, составляет предпочтительно между 250 и 1250 мг/м², и доза цисплатина, которую вводят при каждом введении, составляет между 10 и 200 мг/м².

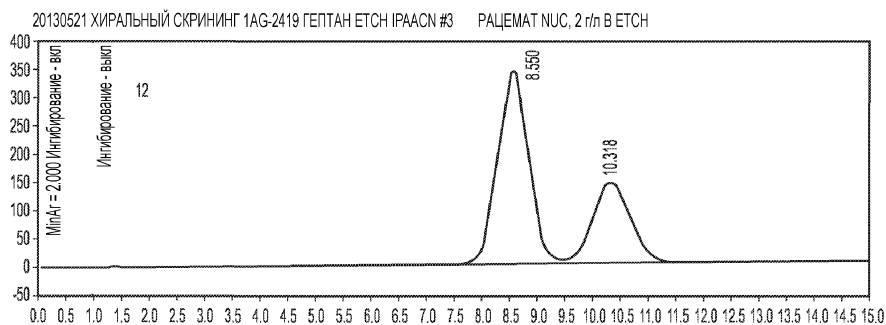
16. Способ по любому из пп.8-15, где введение комбинации обеспечивает t_{1/2} внутриклеточного dFdCTP более чем 10 ч.

17. Способ по любому из пп.8-16, где введение комбинации обеспечивает t_{1/2} внутриклеточного dFdCTP более чем 18 ч.

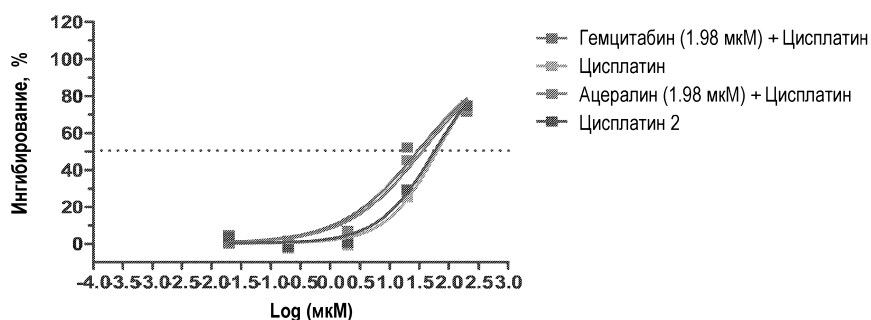
18. Набор для использования в способе по пп.8-17, содержащий два отдельных состава, которые будут использоваться вместе, при этом составы представляют собой

первый состав, содержащий гемцитабин-[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент; и

второй состав, содержащий цисплатин и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2