

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013126630/15, 11.11.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.11.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.11.2010 ЕР 10382300.1

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2014 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 20.12.2016 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP1806349 A1, 11.07.2007. WO03001427 A1, 03.01.2003. WO2004035613 A2, 29.04.2004. J. SCAIFE, D. KERR. Antimetabolites in Cancer Therapy. Anticancer Therapeutics. 2008. PP.91-110.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 13.06.2013

(86) Заявка РСТ:
ЕР 2011/069976 (11.11.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/062920 (18.05.2012)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

МОНЕО ОКАНЬЯ Виктория (ES),
САНТАМАРИЯ НУНЬЕС Хема (ES),
ГАРСИА ФЕРНАНДЕС Луис Франиско
(ES),
ГАЛМАРИНИ Карлос Мария (ES),
ГИЛЬЕН НАВАРРО Мария Хоце (ES),
АВИЛЕС МАРИН Пабло Мануэль (ES)

(73) Патентообладатель(и):

ФАРМА МАР, С.А. (ES)

R U
C 2
C 5
C 3
C 3
C 5
2 6 0
U R
C 2R U
2 6 0 5 3 3 5
C 2

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ АЛКАЛОИДОМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к способам лечения рака, включающим введение синергитической комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с терапевтически эффективным количеством антиметаболита, в котором антиметаболит выбран из 5-фторурацила, гемцитабина, цитарабина, капецитабина, децитабина,

флоксуридина, аминоптерина, метотрексата, пеметрекседа и ралтитрекседа, а также к применению указанных синергитических комбинаций для лечения рака и производства лекарственного средства для лечения рака. Группа изобретений эффективна в лечении рака. 3 н. и 5 з.п. ф-лы, 296 ил., 26 табл., 21 пр.

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 605 335⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 31/4995 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2013126630/15, 11.11.2011

(24) Effective date for property rights:
11.11.2011

Priority:

(30) Convention priority:
12.11.2010 EP 10382300.1

(43) Application published: 20.12.2014 Bull. № 35

(45) Date of publication: 20.12.2016 Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: 13.06.2013

(86) PCT application:
EP 2011/069976 (11.11.2011)

(87) PCT publication:
WO 2012/062920 (18.05.2012)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij Partnery"

(72) Inventor(s):

MONEO OKANJA Viktorija (ES),
SANTAMARIJA NUNES KHema (ES),
GARSIA FERNANDES Luis Fransisko (ES),
GALMARINI Karlos Marija (ES),
GILEN NAVARRO Marija KHose (ES),
AVILES MARIN Pablo Manuel (ES)

(73) Proprietor(s):

FARMA MAR, S.A. (ES)

R
U
2
6
0
5
3
3
5

C
2

(54) COMBINATION THERAPY WITH AN ANTITUMOR ALKALOID

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to methods of treating cancer comprising administering the synergistic combination of RM01183 or its pharmaceutically acceptable salt with a therapeutically effective amount of antimetabolite, wherein antimetabolite is selected from 5-fluorouracil, gemcitabine, cytarabine, capecitabine, decitabine,

flouxuridine, aminopterin, methotrexate, pemetrexed and raltitrexed, as well as to the use of said synergistic combinations for treating cancer and preparing a drug for treating cancer.

EFFECT: group of inventions is effective in treating cancer.

8 cl, 296 dwg, 26 tbl, 21 ex

C
2
6
0
5
3
3
5

R
U

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 с другими противораковыми лекарственными средствами, выбранными из противоопухолевых платиновых координационных комплексов, антиметаболитов, ингибиторов митоза, 5 противораковых антибиотиков, ингибиторов топоизомеразы I и/или II, ингибиторов протеасом, ингибиторов деацетилазы гистонов, алкилирующих агентов, являющихся азотистыми производными горчичного газа, алкилирующих агентов группы 10 нитрозомочевины, неклассических алкилирующих агентов, антагонистов эстрогенов, антагонистов андрогенов, ингибиторов mTOR, ингибиторов тирозинкиназы и других агентов, выбранных из аплидина, ET-743, РМ02734 и РМ00104, и к применению указанных комбинаций для лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рак развивается, когда клетки в части тела начинают бесконтрольно размножаться. Хотя существует множество видов рака, все они возникают вследствие бесконтрольного 15 роста ненормальных клеток. Раковые клетки могут проникать в близлежащие ткани и могут распространяться с кровотоком и через лимфатическую систему в другие части тела. Существует несколько главных типов рака. Карцинома представляет собой злокачественное новообразование, которое представляет собой неконтролируемый и прогрессирующий патологический рост, возникающих из эпителиальных клеток. 20 Эпителиальные клетки покрывают внутренние и внешние поверхности тела, включая органы, выстилку сосудов и других малых полостей. Саркома представляет собой рак, возникающий из клеток кости, хряща, жира, мышц, кровеносных сосудов или другой соединительной или опорной ткани. Лейкоз представляет собой рак, который возникает в кроветворящей ткани, такой как костный мозг, и вызывает появление и проникновение 25 в кровоток больших количеств патологических клеток крови. Лимфома и множественная миелома представляют собой раки, которые возникают из клеток иммунной системы.

Кроме того, рак является инвазивным и имеет тенденцию инфильтрировать 30 окружающие ткани и образовывать метастазы. Он может распространяться непосредственно в окружающие ткани, а также распространяться через лимфатическую и кровеносную системы в другие части тела.

Существует множество способов лечения рака, включая хирургические вмешательства 35 и облучение при локализованных заболеваниях, а также химиотерапию. Однако эффективность существующих способов лечения многих типов рака является ограниченной, и существует потребность в новых, улучшенных формах лечения, демонстрирующих клинически благоприятное действие. Это особенно относится к тем пациентам, у которых имеется запущенное и/или метастатическое заболевание, а также 40 к пациентам, имеющим рецидив в виде прогрессирующего заболевания после ранее проводившегося стандартного лечения, которое стало неэффективным или непереносимым благодаря приобретенной резистентности или ограничениям в использовании лекарственных средств из-за токсичности.

С 1950-х гг. химиотерапевтическое лечение рака значительно продвинулось. К сожалению, более 50% всех раковых пациентов не реагируют на первоначальную терапию или переносят рецидив после первоначального ответа на лечение, и, в конечном итоге, умирают от прогрессирующего заболевания с метастазами. Таким образом, 45 современная политика по разработке и открытию новых противораковых агентов является критически важной.

Химиотерапия, в ее классической форме, фокусируется, прежде всего, на уничтожении быстро пролиферирующих раковых клеток путем нацеливания на главные клеточные

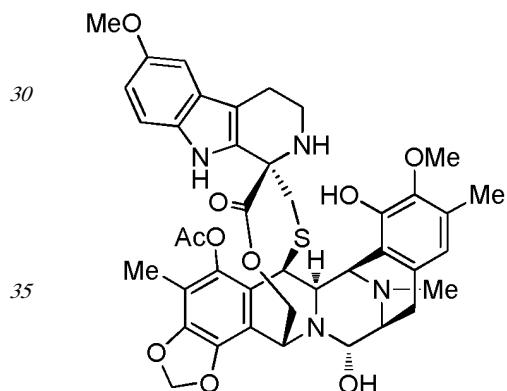
метаболические процессы, включая биосинтез ДНК, РНК и белков.

Химиотерапевтические лекарственные средства разделяются на несколько групп в зависимости от того, как они воздействуют на специфические химические вещества в раковых клетках, с какими клеточными функциями или процессами взаимодействует

- 5 лекарственное средство и на какие конкретно фазы клеточного цикла влияет лекарственное средство. Наиболее распространенные типы химиотерапевтических лекарственных средств включают в себя: ДНК-алкилирующие лекарственные средства (такие как циклофосфамид, ifосфамид, цисплатин, карбоплатин, дакарбазин), антиметаболиты (5-фторурацил, капецитабин, 6-меркаптопурин, метотрексат,
- 10 гемцитабин, цитарабин, флударабин), ингибиторы митоза (такие как паклитаксел, доцетаксел, винбластин, винкристин), противораковые антибиотики (такие как даунорубицин, доксорубицин, эпирюбицин, идарубицин, митоксантрон), ингибиторы топоизомеразы I и/или II (такие как топотекан, иринотекан, этопозид, тенипозид) и гормональные лекарственные средства (такие как тамоксифен, флютамид).

- 15 Идеальное противоопухолевое лекарственное средство должно убивать раковые клетки селективно, с широким индексом относительно его токсичности в отношении нераковых клеток, и оно также должно сохранять свою эффективность против раковых клеток даже после продолжительного воздействия лекарственного средства. К сожалению, ни один из современных химиотерапевтических агентов не обладает
- 20 идеальным профилем. Большинство из них имеют очень узкие терапевтические индексы, и, кроме того, раковые клетки, подвергшиеся воздействию незначительно сублетальных концентраций химиотерапевтического агента, могут развивать резистентность к данному агенту и, довольно часто, перекрестную резистентность к нескольким другим противоопухолевым агентам.

- 25 PM01183, также известный как триптамицидин, представляет собой синтетический алкалоид, который в настоящее время проходит клинические испытания для лечения рака и имеет следующую химическую структуру:



- PM01183 показал весьма мощную активность *in vitro* против клеточных линий 30 солидных и несолидных опухолей, а также значительную активность *in vivo* в отношении нескольких ксенотрансплантов человеческих опухолевых клеточных линий у мышей, таких как рак молочной железы, почки и яичника. PM01183 оказывает свое 35 противораковое действие через ковалентную модификацию гуанинов в малой борозде ДНК, которая в итоге вызывает двухнитевой разрыв ДНК, остановку S-фазы и апоптоз в раковых клетках. Дополнительную информацию, касающуюся данного соединения, можно найти в WO 03/01427; 100-й ежегодный съезд AACR, 18-22 апреля 2009 г., Денвер, CO, реферат № 2679 и реферат № 4525 и в Leal JFM et al., Br.J.Pharmacol., 2010, 161, 1099-1110.

Поскольку рак является главной причиной смерти у животных и человека,

осуществлялось и до сих пор осуществляется несколько попыток получения лекарственного средства, активного и безопасного для введения пациентам, страдающим раком. Проблемой, которую должно решить настоящее изобретение, является создание противораковых лекарственных средств, которые являются пригодными для лечения

⁵ рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение утверждает, что РМ01183 потенцирует противоопухолевую активность других противораковых агентов, в частности других противораковых лекарственных средств, выбранных из противоопухолевых платиновых

¹⁰ координационных комплексов, антиметаболитов, ингибиторов митоза, противораковых антибиотиков, ингибиторов топоизомеразы I и/или II, ингибиторов протеасом, ингибиторов деацетилазы гистонов, алкилирующих агентов, являющихся азотистыми производными горчичного газа, алкилирующих агентов группы нитрозомочевины, неклассических алкилирующих агентов, антагонистов эстрогенов, антагонистов

¹⁵ андрогенов, ингибиторов mTOR, ингибиторов тирозинкиназы и других агентов, выбранных из аплидина, ET-743, РМ02734 и РМ00104. Таким образом, РМ01183 и указанные другие противораковые агенты можно успешно применять в комбинированной терапии для лечения рака.

Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, ²⁰ наборам и способам для лечения рака с использованием указанной комбинированной терапии и к применению обоих лекарственных средств для лечения рака и для производства лекарственных средств для комбинированной терапии.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к эффективной комбинированной терапии для лечения рака на основе РМ01183 или его ²⁵ фармацевтически приемлемой соли с использованием другого противоракового лекарственного средства, как определено выше.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли для применения для лечения рака, включающего в себя введение терапевтически эффективного количества РМ01183 или его ³⁰ фармацевтически приемлемой соли в комбинации с терапевтически эффективным количеством другого противоракового лекарственного средства.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ³⁵ лечения рака, включающему в себя введение пациенту, который нуждается в указанном лечении, терапевтически эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли и терапевтически эффективного количества другого противоракового лекарственного средства.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ⁴⁰ увеличения или потенцирования терапевтической эффективности противоракового лекарственного средства для лечения рака, который включает в себя введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с указанным другим противораковым лекарственным средством.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного ⁴⁵ средства для лечения рака путем комбинированной терапии с использованием РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической

композиции, включающей в себя РМ01183 или его фармацевтически приемлемую соль и/или другое противораковое лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель, для использования в комбинированной терапии для лечения рака.

Изобретение относится также к набору для применения для лечения рака, который включает в себя лекарственную форму РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли и/или лекарственную форму другого противоракового лекарственного средства и инструкции по применению обоих лекарственных средств в комбинации.

В одном предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к синергическим комбинациям РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с другим противораковым лекарственным средством.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1-20. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с оксалиплатином, 5-фторурацилом, гемцитабином, паклитакселом, доцетакселом, винкристином, даунорубицином, митомицином С, актиномицином D, топотеканом, этопозидом, бортезомибом, вориностатом, циклофосфамидом, кармустином, дакарбазином, темсиролимусом, эрлотинибом, ЕТ-743 и РМ00104 соответственно.

Фиг. 21-41. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, цитарабином, гемцитабином, доцетакселом, винкристином, винорелбином, даунорубицином, митомицином С, актиномицином D, топотеканом, этопозидом, вориностатом, циклофосфамидом, дакарбазином, темсиролимусом, эрлотинибом, аплидином, ЕТ-743, РМ02734 и РМ00104 соответственно против клеток А673.

Фиг. 42-56. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с цисплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, метотрексатом, даунорубицином, доксорубицином, митомицином С, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, дакарбазином, темсиролимусом, ЕТ-743, РМ02734 и РМ00104 соответственно против клеток SK-MEL-2.

Фиг. 57-80. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, доцетакселом, паклитакселом, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, митомицином С, актиномицином D, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, бортезомибом, вориностатом, флутамидом, темсиролимусом, эрлотинибом, ЕТ-743, РМ02734 и РМ00104 соответственно против клеток РС-3.

Фиг. 81-98. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, даунорубицином, доксорубицином, актиномицином D, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, бортезомибом, вориностатом, темсиролимусом, эрлотинибом, ЕТ-743, РМ02734 и РМ00104 соответственно против клеток PANC-1.

Фиг. 99-123. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, паклитакселом, винкристином, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, актиномицином D, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, бортезомибом, вориностатом, циклофосфамидом, дакарбазином, темсиролимусом, эрлотинибом, аплидином, ЕТ-743, РМ02734 и РМ00104 соответственно против клеток HGC-27.

Фиг. 124-150. Данные по активности *in vitro* РМ01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, доцетакселом, паклитакселом, винкристином, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, актиномицином D, митомицином С, топотеканом, иринотеканом,

этопозидом, вориностатом, циклофосфамидом, кармустином, дакарбазином, темсиролимусом, эрлотинибом, аплидином, ET-743, PM02734 и PM00104 соответственно против клеток IGROV-1.

Фиг. 151-170. Данные по активности *in vitro* PM01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, доцетакселом, паклитакселом, винкристином, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, бортезомибом, циклофосфамидом, эрлотинибом, ET-743 и PM00104 соответственно против клеток HEP-G2.

Фиг. 171-197. Данные по активности *in vitro* PM01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, доцетакселом, паклитакселом, винкристином, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, актиномицином D, митомицином C, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, вориностатом, циклофосфамидом, кармустином, дакарбазином, тамоксифеном, темсиролимусом, эрлотинибом, ET-743, PM02734 и PM00104 соответственно против клеток MDA-MB-231.

Фиг. 198-219. Данные по активности *in vitro* PM01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, доцетакселом, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, актиномицином D, митомицином C, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, бортезомибом, вориностатом, циклофосфамидом, дакарбазином, темсиролимусом, эрлотинибом, аплидином и PM02734 соответственно против клеток HT-29.

Фиг. 220-242. Данные по активности *in vitro* PM01183 в комбинации с цисплатином, 5-фторурацилом, цитарабином, гемцитабином, метотрексатом, доцетакселом, винкристином, винорелбином, даунорубицином, доксорубицином, актиномицином D, митомицином C, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, вориностатом, циклофосфамидом, дакарбазином, эрлотинибом, аплидином, ET-743, PM02734 и PM00104 соответственно против клеток RXF-393.

Фиг. 243-262. Данные по активности *in vitro* PM01183 в комбинации с цисплатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, гемцитабином, метотрексатом, доцетакселом, винкристином, даунорубицином, доксорубицином, топотеканом, иринотеканом, этопозидом, бортезомибом, вориностатом, дакарбазином, темсиролимусом, эрлотинибом, аплидином, ET-743 и PM02734 соответственно против клеток U87-MG.

Фиг. 263. Оценка объема опухолей A2780 у мышей, леченных плацебо, PM01183, паклитакселом и PM01183 плюс паклитаксел.

Фиг. 264. Оценка объема опухолей A2780 у мышей, леченных плацебо, PM01183, винорелбином и PM01183 плюс винорелбин.

Фиг. 265. Оценка объема опухолей A2780 у мышей, леченных плацебо, PM01183, доксорубицином и PM01183 плюс доксорубицин.

Фиг. 266. Оценка объема опухолей HGC-27 у мышей, леченных плацебо, PM01183, цисплатином и PM01183 плюс цисплатин.

Фиг. 267. Оценка объема опухолей HGC-27 у мышей, леченных плацебо, PM01183, 5-фторурацилом и PM01183 плюс 5-фторурацил.

Фиг. 268. Оценка объема опухолей SW1990 у мышей, леченных плацебо, PM01183, гемцитабином и PM01183 плюс гемцитабин.

Фиг. 269. Оценка объема опухолей U87-MG у мышей, леченных плацебо, PM01183, темозоломидом и PM01183 плюс темозоломид.

Фиг. 270. Оценка объема опухолей H460 у мышей, леченных плацебо, PM01183,

иринотеканом и PM01183 плюс иринотекан.

Фиг. 271. Оценка объема опухолей HT1080 у мышей, леченных плацебо, PM01183, дакарбазином и PM01183 плюс дакарбазин.

Фиг. 272. Оценка объема опухолей HT-29 у мышей, леченных плацебо, PM01183,

⁵ иринотеканом и PM01183 плюс иринотекан.

Фиг. 273. Эффекты комбинации PM01183 с метотрексатом на клеточной линии JURKAT.

Фиг. 274. Эффекты комбинации PM01183 с метотрексатом на клеточной линии MOLT-4.

¹⁰ Фиг. 275. Эффекты комбинации PM01183 с даунорубицином на клеточной линии JURKAT.

Фиг. 276. Эффекты комбинации PM01183 с аплидином на клеточной линии JURKAT.

Фиг. 277. Эффекты комбинации PM01183 с аплидином на клеточной линии MOLT-4.

¹⁵ Фиг. 278. Эффекты комбинации PM01183 с ET-743 на клеточной линии JURKAT.

Фиг. 279. Эффекты комбинации PM01183 с ET-743 на клеточной линии MOLT-4.

Фиг. 280. Эффекты комбинации PM01183 с PM00104 на клеточной линии JURKAT.

Фиг. 281. Эффекты комбинации PM01183 с PM00104 на клеточной линии MOLT-4.

Фиг. 282. Эффекты комбинации PM01183 с PM02734 на клеточной линии JURKAT.

²⁰ Фиг. 283. Эффекты комбинации PM01183 с PM02734 на клеточной линии MOLT-4.

Фиг. 284. Эффекты комбинации PM01183 с цитарабином на клеточной линии RAMOS.

Фиг. 285. Эффекты комбинации PM01183 с метотрексатом на клеточной линии RAMOS.

Фиг. 286. Эффекты комбинации PM01183 с метотрексатом на клеточной линии U-

²⁵ 937.

Фиг. 287. Эффекты комбинации PM01183 с гемцитабином на клеточной линии RAMOS.

Фиг. 288. Эффекты комбинации PM01183 с гемцитабином на клеточной линии U-937.

Фиг. 289. Эффекты комбинации PM01183 с даунорубицином на клеточной линии RAMOS.

³⁰ Фиг. 290. Эффекты комбинации PM01183 с даунорубицином на клеточной линии U-937.

Фиг. 291. Эффекты комбинации PM01183 с ET-743 на клеточной линии RAMOS.

Фиг. 292. Эффекты комбинации PM01183 с ET-743 на клеточной линии U-937.

Фиг. 293. Эффекты комбинации PM01183 с PM00104 на клеточной линии RAMOS.

³⁵ Фиг. 294. Эффекты комбинации PM01183 с PM00104 на клеточной линии U-937.

Фиг. 295. Эффекты комбинации PM01183 с PM02734 на клеточной линии RAMOS.

Фиг. 296. Эффекты комбинации PM01183 с PM02734 на клеточной линии U-937.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявители неожиданно установили, что PM01183 в высокой степени усиливает

⁴⁰ противораковую активность других противораковых лекарственных средств, когда указанные противораковые лекарственные средства комбинируют с PM01183. Таким образом, настоящее изобретение относится к эффективному лечению рака на основе комбинации PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с другим противораковым лекарственным средством.

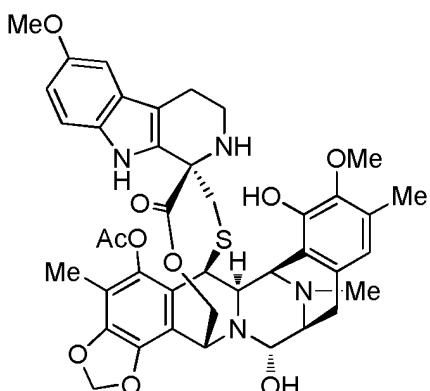
⁴⁵ В настоящей заявке под «раком» подразумеваются опухоли, новообразования и любые другие злокачественные заболевания, причиной которых являются злокачественные ткани или клетки.

Термин «процесс лечения», используемый в настоящем документе, если не указано

иное, означает обеспечение обратного развития, облегчение или ингибиование прогрессирования заболевания или состояния, к которому применяется указанный термин, или одного или более симптомов указанного заболевания или состояния. Термин «лечение», если не указано иное, относится к акту процесса лечения,
5 определенного непосредственно выше.

Термин «комбинация», используемый в настоящем описании, означает введение пациенту, страдающему раком, указанных терапевтических агентов в одной и той же или отдельных фармацевтических композициях и в одно и то же или в разное время. Если терапевтические агенты вводят в разное время, их следует вводить достаточно
10 близко по времени, чтобы гарантировать потенцирование или синергический ответ.

Как упоминалось выше, PM01183 представляет собой синтетический алкалоид, имеющий следующую структуру:



Термин «PM01183» относится и к любым его фармацевтически приемлемым солям, сольватам, гидратам, пролекарствам или любым другим соединениям, которые, после введения пациенту, способны образовывать (прямо или опосредованно) описанное в настоящем документе соединение. Получение солей, сольватов, гидратов и пролекарств можно легко осуществить способами, известными специалистам.
25

Фармацевтически приемлемые соли можно синтезировать из родительского соединения, которое содержит основную или кислотную часть, обычными химическими способами. Обычно указанные соли получают, например, реакцией свободных кислотных или основных форм указанных соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или их смеси. Обычно предпочтительными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Примеры кислотно-аддитивных солей включают в себя минеральные кислотно-аддитивные соли, такие как, например, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, нитрат, фосфат, органические кислотно-аддитивные соли, такие как, например, ацетат, трифторацетат, малеат, фумарат, цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, малат, манделат, метансульфонат и п-толуолсульфонат. Примеры основно-аддитивных солей включают в себя неорганические соли, такие как, например, натриевые, калиевые, кальциевые и аммонийные соли, и соли с органическими основаниями, такие как, например, соли с этилендиамином, этианоламином, N,N-диалкиленэтаноламином, триэтаноламином и основными аминокислотами.
30
35
40

Любое соединение, которое представляет собой пролекарство PM01183, подпадает под объем и идею настоящего изобретения. Термин «пролекарство» используется в самом широком смысле и включает в себя такие производные, которые *in vivo* конвертируются в PM01183. Пролекарство может гидролизироваться, окисляться или как-либо иначе реагировать в биологических условиях с образованием PM01183.
45

Примеры пролекарств включают в себя, без ограничения, производные и метаболиты PM01183, которые включают в себя биогидролизуемые части, такие как биогидролизуемые амины, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и

- 5 биогидролизуемые фосфатные аналоги. Пролекарства обычно можно изготовить с использованием хорошо известных способов, таких, которые описаны Burger в «Medicinal Chemistry and Drug Discovery», 6-е изд. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) и «Design and Applications of Prodrugs» (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers).

Помимо этого, любое лекарственное средство, упомянутое в настоящем документе, 10 может быть в аморфной форме или в кристаллической форме как в виде свободного соединения, так и в виде сольватов (например, гидратов), и подразумевается, что обе формы входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, PM01183 для применения по настоящему изобретению можно получать 15 с использованием процесса синтеза, такого, который описан в WO 03/014127, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

Фармацевтические композиции PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли, 20 которые можно использовать, включают в себя растворы, суспензии, эмульсии, лиофилизированные композиции и т.п. с подходящими наполнителями для внутривенного введения. Предпочтительно, PM01183 может поставляться и храниться в виде стерильного лиофилизированного продукта, включающего в себя PM01183 и 25 наполнители, в форме, подходящей для терапевтического применения. Для дальнейшего руководства, касающегося фармацевтических композиций PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли, см., например, композиции, описанные в WO 2006/046079, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

25 Введение PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтических композиций, включающих указанное соединение, предпочтительно, осуществляют внутривенной инфузией. Можно использовать время инфузии до 72 часов, более предпочтительно, от 1 до 24 часов, наиболее предпочтительно, приблизительно от 1 часа до 3 часов. Непродолжительное время инфузии, которое позволяет пациенту 30 осуществлять лечение, не оставаясь в больнице на ночь, является особенно желательным. Однако инфузия может продолжаться около 24 часов или даже дольше, если это требуется.

Предпочтительно, введение PM01183 осуществляют циклами. В соответствии с 35 предпочтительной схемой введения внутривенную инфузию PM01183 проводят пациентам в течение первой недели каждого цикла, а оставшуюся часть цикла пациенты восстанавливаются. Предпочтительная продолжительность каждого цикла составляет 3 или 4 недели. Если требуется, можно проводиться множество циклов. Введение PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли путем внутривенной инфузии в 40 течение 1 часа один раз в 3 недели является наиболее предпочтительной схемой введения, хотя и другие протоколы можно рекомендовать в качестве вариаций.

В настоящем изобретении особенно предпочтительной является комбинация PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из противоопухолевых платиновых координационных комплексов, антиметаболитов, ингибиторов митоза, противораковых антибиотиков, 45 ингибиторов топоизомеразы I и/или II, ингибиторов протеасом, ингибиторов деацетилазы гистонов, алкилирующих агентов, являющихся азотистыми производными горчичного газа, алкилирующих агентов группы нитрозомочевины, неклассических алкилирующих агентов, антагонистов эстрогенов, антагонистов андрогенов,

ингибиторов mTOR, ингибиторов тирозинкиназы и других агентов, выбранных из аплидина, ET-743, PM02734 и PM00104, для лечения рака.

Особенно предпочтительными типами рака являются типы рака, выбранные из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака мочевого пузыря, рака

5 предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы (также известной как рак печени), рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака пищевода, нейробластомы, рака головного мозга, рака шейки матки, анального рака, рака яичка, лейкоза, множественной миеломы и лимфомы.

10 В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с противоопухолевым платиновым координационным комплексом для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака

15 предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, тетранитрат платины (BBR3464), сатраплатин, тетраплатин, ормиплатин, ипроплатин, недаплатин и лобаплатин.

Особенно предпочтительной является комбинация PM01183 или его фармацевтически 20 приемлемой соли с цисплатином, оксалиплатином, карбоплатином, тетранитратом платины, сатраплатином, тетраплатином, ормиплатином, ипроплатином, недаплатином и лобаплатином и еще более предпочтительной является комбинация с цисплатином и оксалиплатином для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака 25 поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с антиметаболитом для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного 30 из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака пищевода, рака головного мозга, анального рака, лейкоза и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, 5-фторурацил,

35 гемцитабин, цитарabin, капецитабин, децицитабин, флоксуродин, флударабин, аминоптерин, метотрексат, пеметрексед, ралтитрексед, кладрибин, клофарабин, меркаптопурин, пентостатин и тиогуанин. Особенно предпочтительной является комбинация PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с 5-фторурацилом, гемцитабином, цитарабином, капецитабином, децитабином, флоксуродином,

40 флударабином, аминоптерином, метотрексатом, пеметрекседом, ралтитрекседом, кладрибином, клофарабином, меркаптопурином, пентостатином и тиогуанином и еще более предпочтительной является комбинация с 5-фторурацилом, гемцитабином, цитарабином и метотрексатом для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака

45 предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга, лейкоза и лимфомы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение

относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором митоза для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга, лейкоза и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, паклитаксел, доцетаксел, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с паклитакселом, доцетакселом, винбластином, винкристином, виндезином и винорелбином и еще более предпочтительной является комбинация с паклитакселом, доцетакселом, винкристином и винорелбином для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, рака предстательной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с противораковым антибиотиком для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, нейробластомы, рака головного мозга, анального рака, рака яичка, лейкоза, множественной миеломы и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, даунорубицин, доксорубицин, эпирюбицин, идараубицин, митоксанtron, пиксанtron, валрубицин, митомицин С, блеомицин, актиномицин D и митрамицин. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с даунорубицином, доксорубицином, эпирюбицином, идараубицином, митоксанtronом, пиксанtronом, валрубицином, митомицином С, актиномицином D и митрамицином и еще более предпочтительной является комбинация с даунорубицином, доксорубицином, митомицином С и актиномицином В для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга, лейкоза и лимфомы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором топоизомеразы I и/или II для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, нейробластомы, рака головного мозга, рака шейки матки, рака яичка, лейкоза и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, топотекан, SN-38, иринотекан, камптотецин, рубитекан, этопозид, амсакрин и тенипозид. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с топотеканом, SN-38, иринотеканом, камптотецином, рубитеканом, этопозидом, амсакрином и тенипозидом и еще более предпочтительной является комбинация с топотеканом, иринотеканом и этопозидом для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором протеосом для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, гепатомы, колоректального рака, рака головного мозга, множественной миеломы и лимфомы.

Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, бортезомиб, дисульфирам, галлат эпигаллокатехина и салиноспорамид А. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с бортезомибом, дисульфирамом, галлатом эпигаллокатехина и салиноспорамидом

10 А и еще более предпочтительной является комбинация с бортезомибом для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака, выбранного из рака легкого, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, гепатомы, колоректального рака и рака головного мозга.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение

15 относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором деацетилазы гистонов, для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, саркомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает

20 в себя, без ограничения, ромидепсин, панобиностат, вориностат, моцетиностат, белиностат, энтиностат, ресминостат, PCI-24781, AR-42, CUDC-101 и вальпроевую кислоту. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ромидепсином, панобиностатом, вориностатом, моцетиностатом, белиностатом, энтиностатом, ресминостатом, PCI-24781, AR-42, CUDC-

25 101 и вальпроевой кислотой и еще более предпочтительной является комбинация с вориностатом для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака легкого, саркомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга.

30 В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с алкилирующим агентом, являющимся азотистым производным горчичного газа, для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, саркомы, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, лейкоза, множественной миеломы и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, мелфалан, ifосфамид, хлорамбуцил, циклофосфамид, мехлоретамин, урамустин, эстрамустин и бендамустин. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с мелфаланом, ifосфамидом, хлорамбуцилом, циклофосфамидом,

35 40 мехлоретамином, урамустином, эстрамустином и бендамустином и еще более предпочтительной является комбинация с циклофосфамидом для лечения рака, более предпочтительно для лечения рака легкого, саркомы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака и рака почки.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение

45 относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с алкилирующим агентом группы нитрозомочевины для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, рака яичника, рака молочной железы, рака головного мозга, множественной миеломы и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает

в себя, без ограничения, ломустин, сумустин, кармустин, фотемустин и стрептозоцин. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ломустином, семустином, кармустином, фотемустином и стрептозоцином и еще более предпочтительной является комбинация с кармустином 5 для лечения рака, более предпочтительно рака легкого, рака яичника и рака молочной железы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с неклассическим алкилирующим агентом для лечения рака, более конкретно для лечения 10 рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга, лейкоза и лимфомы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, прокарбазин, дакарбазин, темозоломид и алтретамин. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически 15 приемлемой соли с прокарбазином, дакарбазином, темозоломидом и алтретамином и еще более предпочтительной является комбинация с дакарбазином и тезоломидом для лечения рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака желудка, рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение 20 относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с антагонистом эстрогенов для лечения рака, более конкретно для лечения рака молочной железы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, торемифен, фулвестрант, тамоксифен и нафоксидин. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с 25 торемифеном, фулвестрантом, тамоксифеном и нафоксидином и еще более предпочтительной является комбинация с тамоксифеном для лечения рака молочной железы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с 30 антагонистом андрогенов для лечения рака, более конкретно для лечения рака предстательной железы. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, бикалутамид, флутамид, MDV3100 и нилутамид. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с бикалутамидом, флутамидом, MDV3100 и нилутамидом и еще более 35 предпочтительной является комбинация с флутамидом для лечения рака предстательной железы.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором mTOR для лечения рака, более конкретно для лечения рака легкого, 40 саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, сиролимус, темсиролимус, эверолимус, ридафоролимус, KU-0063794 и WYE-354. Особенно предпочтительной является комбинация РМ01183 или 45 его фармацевтически приемлемой соли с сиролимусом, темсиролимусом, эверолимусом, ридафоролимусом KU-0063794 и WYE-354 и еще более предпочтительной является комбинация с темсиролимусом для лечения рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка,

рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака и рака головного мозга.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором тирозинкиназы для лечения рака, более конкретно для лечения рака,

⁵ выбранного из рака легкого, саркомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга. Указанная химиотерапевтическая группа включает в себя, без ограничения, эрлотиниб, сорафениб, акситиниб, бозутиниб, седираниб, кризотиниб, дасатиниб, гефитиниб, иматиниб,

¹⁰ канертиниб, лапатиниб, лестауртиниб, нератиниб, нилотиниб, семаксаниб, сунитиниб, ваталаниб и вандетаниб. Особенno предпочтительной является комбинация РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с эрлотинибом, сорафенибом, акситинибом, бозутинибом, седиранибом, кризотинибом, дасатинибом, гефитинибом, иматинибом, канертинибом, лапатинибом, лестауртинибом, нератинибом, нилотинибом,

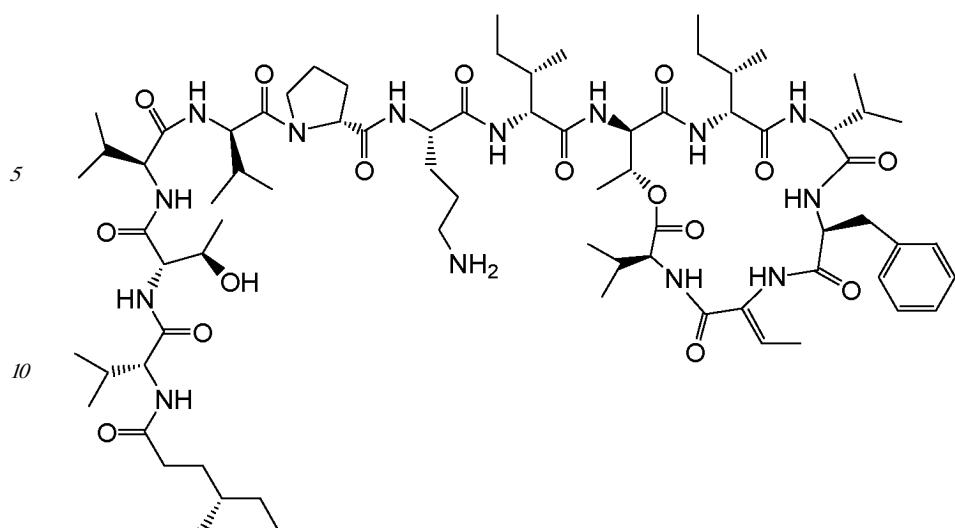
¹⁵ семаксанибом, сунитинибом, ваталанибом и вандетанибом и еще более предпочтительной является комбинация с эрлотинибом для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки и рака головного мозга.

²⁰ В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с аплидином для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из саркомы, рака желудка, рака яичника, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга и лейкоза.

²⁵ В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с ЕТ-743 (трабектедином) для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака почки, рака молочной железы, рака почки, лейкоза и лимфомы.

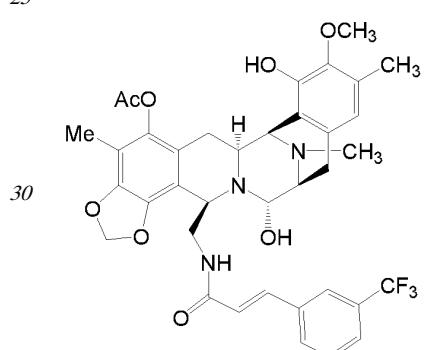
³⁰ В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинации РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с РМ02734 для лечения рака, более конкретно для лечения рака, выбранного из саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака головного мозга, лейкоза и лимфомы.

³⁵ РМ02734 ((4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-allo-Ile-cyclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val)) представляет собой синтетический дипептид, относящийся к семейству кахалалидовых соединений, который в настоящее время проходит клинические испытания для лечения рака. Указанное соединение является предметом WO 2004/035613 и имеет следующую структуру:



В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к комбинации PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с PM00104 для лечения рака и, более конкретно, для лечения рака, выбранного из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, рака почки, лейкоза и лимфомы.

PM00104 представляет собой синтетический алкалоид, относящийся к джорумицину и рениерамицинам, а также к сафрамицину и сафрамициновым соединениям, который в настоящее время проходит клинические испытания для лечения рака и имеет следующую структуру:



Дополнительные подробности о PM00104 см. в WO 01/87894.

Изобретение включает в себя любую фармацевтически приемлемую соль любого лекарственного средства, упомянутого в настоящем документе, которая может быть синтезирована из родительского соединения любыми обычными способами, как было описано ранее.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к синергическим комбинациям PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из перечня лекарственных средств, представленного выше. Доказательства синергизма можно получить тестированием комбинаций и анализом результатов, например, способом Чоу-Талалая или любым другим подходящим способом, таким как способы, представленные в разделе «Примеры».

Возможные благоприятные результаты синергизма включают в себя: 1) повышение эффективности терапевтического воздействия, 2) уменьшение дозировки при повышении

или сохранении такой же эффективности для избежания токсичности, 3) минимизацию или замедление развития резистентности к лекарственным средствам и 4) обеспечение селективного синергизма в отношении мишени (или синергизма эффективности) по сравнению с хозяином (или антагонизм токсичности). Соответственно, при

- 5 использовании комбинации двух химиотерапевтических агентов, обладающих синергизмом, схема лечения будет отличаться от схемы, при которой комбинация двух лекарственных средств демонстрирует только аддитивный эффект. С указанной точки зрения, если имеет место синергизм, может потребоваться более низкая доза одного или обоих агентов (по сравнению с количествами, которые используются при терапии
- 10 одним лекарственным средством) для обеспечения такой же или даже большей эффективности, а возможные токсические эффекты могут быть уменьшены или даже отсутствовать. Альтернативно, если доза обоих лекарственных средств в комбинации является такой же, как при использовании по отдельности (в качестве единственных агентов), можно ожидать повышения эффективности комбинации. Таким образом,
- 15 наличие синергизма в данной комбинации лекарственных средств будет изменять продолжительность лечения и/или схему лечения.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения или потенцирования терапевтической эффективности противоракового лекарственного средства, выбранного из перечня лекарственных средств,

- 20 представленного выше, для лечения рака, который включает в себя введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с указанным другим противораковым лекарственным средством. Доказательства увеличения или потенцирования терапевтической эффективности можно получить тестированием комбинаций и анализом
- 25 результатов, например ингибиования опухолевого роста. Указанное ингибиование опухолевого роста можно оценить сравнением среднего объема опухоли при лечении, объединяющем два лекарственных средства (РМ01183 и другое лекарственное средство), со средним объемом опухоли при монотерапии другим лекарственным средством. С данной точки зрения увеличение или потенцирование терапевтической эффективности
- 30 определяется, когда ответ на комбинированное лечение превышает самый лучший ответ на наиболее активное лекарственное средство, введенное как единственный агент (монотерапия) по той же схеме и при той же дозе, которые используются в комбинированном лечении. Указанный аспект изобретения далее иллюстрируется в разделе «Примеры», особенно в примерах 13-19.

- 35 В другом аспекте изобретение относится к применению РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства для лечения рака путем комбинированной терапии с использованием РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из перечня лекарственных средств, представленного выше.

- 40 В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения рака, включающему в себя введение пациенту, который нуждается в указанном лечении, терапевтически эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с терапевтически эффективным количеством другого противоракового лекарственного средства, выбранного из перечня лекарственных средств,
- 45 представленного выше.

В другом аспекте изобретение относится к РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли для применения для лечения рака, включающего в себя введение терапевтически эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой

соли в комбинации с терапевтически эффективным количеством другого противоракового лекарственного средства, выбранного из перечня лекарственных средств, представленного выше.

Согласно настоящему изобретению РМ01183 или его фармацевтически приемлемая

5 соль и другое противораковое лекарственное средство может поставляться в одном и том же лекарственном препарате или в виде различных лекарственных препаратов для введения в одно и то же время или в разное время. Предпочтительно, РМ01183 или его фармацевтически приемлемую соль и другое противораковое лекарственное средство поставляют в виде различных лекарственных препаратов для введения в разное время.

10 При раздельном введении в разное время первым можно вводить или РМ01183 или его фармацевтически приемлемая соль, или другое противораковое лекарственное средство. Помимо этого, оба лекарственных средства можно вводить в один и тот же день или в разные дни, и их можно вводить с использованием одной и той же схемы или различающихся схем в течение цикла лечения. Кроме того, введение обоих

15 лекарственных средств можно осуществлять с использованием одного и того же пути введения или различных путей введения. Например, оба лекарственных средства можно вводить внутривенно или, альтернативно, одно лекарственное средство можно вводить перорально, а другое - внутривенным путем.

Таким образом, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут

20 включать в себя все компоненты (лекарственные средства) в единой фармацевтически приемлемой композиции, или, альтернативно, компоненты могут помещаться в разные композиции и вводиться в комбинации друг с другом. Различные фармацевтически приемлемые композиции, хорошо известные специалистам, можно использовать в настоящем изобретении. Более того, специалист может осуществлять выбор подходящей

25 композиции для использования в настоящем изобретении с учетом пути введения и характеристик растворимости компонентом композиции.

Корректные дозировки обоих лекарственных средств в комбинации будут варьироваться в соответствии с конкретной композицией, способом применения и конкретной области, пациента и опухоли, подвергаемых лечению. Другие факторы,

30 такие как возраст, масса тела, пол, диета, время введения, скорость экскреции, состояние пациента, другие лекарственные комбинации, реакции чувствительности и тяжесть заболевания, должны приниматься во внимание. Введение можно осуществлять непрерывно или периодически в пределах переносимой дозы.

Комбинацию по настоящему изобретению можно использовать отдельно или в

35 комбинации с одним или более из ряда противораковых агентов или агентов для поддерживающего лечения.

Помимо этого, в зависимости от типа опухоли и стадии развития заболевания, противораковые эффекты лечения по настоящему изобретению включают в себя, без ограничения, ингибирование опухолевого роста, задержку опухолевого роста, регрессию

40 опухоли, уменьшение размеров опухоли, увеличение интервала времени до повторного роста опухоли после прекращения лечения, замедление прогрессирования заболевания и предотвращение появления метастазов. Ожидается, что когда лечение по настоящему изобретению проводится пациенту, такому как пациент-человек, указанное лечение будет оказывать действие, по измерению, например, длительностью противоракового

45 эффекта, степенью ответа, временем до прогрессирования заболевания или коэффициентом выживания. В частности, лечение по настоящему изобретению подходит для пациентов-людей, особенно для тех, у которых наблюдаются рецидивы или рефрактерность к ранее проводившейся химиотерапии. Рассматривается также первая

линия терапии.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору для применения для лечения рака, включающему в себя РМ01183 или его фармацевтически приемлемую соль в виде дозированных единиц для по меньшей мере одного цикла, и напечатанные 5 инструкции для применения РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня, в комбинации.

В родственном аспекте настоящее изобретение относится к набору для применения для лечения рака, включающему в себя РМ01183 или его фармацевтически приемлемую 10 соль в виде дозированных единиц для по меньшей мере одного цикла, другое противораковое лекарственное средство, выбранное из представленного выше перечня, в виде дозированных единиц для по меньшей мере одного цикла, и напечатанные инструкции для применения обоих лекарственных средств в комбинации.

В другом аспекте настоящее изобретение относится также к фармацевтической 15 композиции, включающей в себя РМ01183 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель, для применения в комбинации с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня лекарственных средств, для лечения рака.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится также к фармацевтической 20 композиции, включающей в себя РМ01183 или его фармацевтически приемлемую соль, другое противораковое лекарственное средство, выбранное из представленного выше перечня лекарственных средств, и фармацевтически приемлемый носитель. Указанная фармацевтическая композиция является предпочтительной для применения для лечения рака.

25 В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления композиции для применения в комбинации с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня лекарственных средств, для лечения рака.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению РМ01183 или его 30 фармацевтически приемлемой соли для лечения рака в комбинированной терапии с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня лекарственных средств.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения раковые клетки подвергаются контакту или какому-либо другому воздействию комбинации РМ01183 35 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из представленного выше перечня лекарственных средств. Раковые клетки предпочтительно являются человеческими и включают в себя клетки карциномы, клетки саркомы, клетки лейкоза, клетки лимфомы и клетки миеломы. Более 40 предпочтительно, раковые клетки представляют собой клетки рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака пищевода, нейробластомы, рака головного мозга, рака шейки матки, анального рака, рака яичка, лейкоза, множественной миеломы и лимфомы. Помимо этого, комбинация оказывает 45 синергическое ингибирующее действие против раковых клеток, особенно против человеческих раковых клеток, упомянутых выше.

Например, комбинация ингибирует пролиферацию или выживание контактировавших раковых клеток. Более низкий уровень пролиферации или выживания контактировавших

раковых клеток по сравнению с неконтактировавшими раковыми клетками подтверждает эффективность комбинации PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из представленного выше перечня лекарственных средств, для лечения пациента, страдающего раком.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста раковых клеток, включающему в себя контактирование указанных раковых клеток с эффективным количеством PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня лекарственных средств.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста раковых клеток, включающему в себя контактирование указанных раковых клеток с синергической комбинацией PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из представленного выше перечня лекарственных средств, в котором указанная комбинация обеспечивает улучшенное ингибирование роста раковых клеток по сравнению (i) с PM01183 или его фармацевтически приемлемой солью в отсутствие другого противоракового лекарственного средства или (ii) с другим противораковым лекарственным средством в отсутствие PM01183.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей в себя синергическую комбинацию PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из представленного выше перечня лекарственных средств, для ингибирования роста раковых клеток, в которой указанная комбинация обеспечивает улучшенное ингибирование роста раковых клеток по сравнению (i) с PM01183 или его фармацевтически приемлемой солью в отсутствие другого противоракового лекарственного средства или (ii) с другим противораковым лекарственным средством в отсутствие PM01183.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения комбинация PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из представленного выше перечня лекарственных средств, ингибирует опухолевый рост или уменьшает размеры опухоли *in vivo*. В частности, комбинация ингибирует *in vivo* рост и/или уменьшает размеры карциномы, саркомы, лейкоза, лимфомы и миеломы. Предпочтительно, комбинация ингибирует *in vivo* рост опухолей легкого, саркомы, злокачественной меланомы, мочевого пузыря, предстательной железы, поджелудочной железы, щитовидной железы, желудка, яичника, гепатомы, молочной железы, колоректального рака, почки, пищеводы, нейробластомы, головного мозга, шейки матки, анального рака, яичка, лейкоза, множественной миеломы и лимфомы.

Например, указанные комбинации ингибируют опухолевый рост или уменьшают размеры человеческих раковых ксенотрансплантатов, особенно человеческих опухолевых ксенотрансплантатов желудка, поджелудочной железы, саркомы, легкого, колоректального рака и яичника, у экспериментальных животных. Уменьшение роста или размеров человеческих раковых ксенотрансплантатов у экспериментальных животных указанными комбинациями дополнительно подтверждает эффективность комбинации PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли и другого противоракового лекарственного средства, выбранного из представленного выше перечня лекарственных средств, для лечения пациента, страдающего раком.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения размеров опухоли, включающему в себя введение эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня лекарственных средств.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибиования опухолевого роста, включающему в себя введение эффективного количества РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с другим противораковым лекарственным средством, выбранным из представленного выше перечня лекарственных средств.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение. Указанные примеры не следует интерпретировать как ограничение объема изобретения.

Для более краткого описания некоторые количественные выражения в настоящем документе не квалифицируются термином «приблизительно». Понятно, что, используется ли термин «приблизительно» однозначно или нет, подразумевается, что каждое количество, приведенное в настоящем документе, относится к истинной данной величине, а также подразумевается, что оно относится к приближению к данной величине, что понятно специалисту, включая эквиваленты и приближения, вытекающие из условий эксперимента и/или измерения для указанной данной величины.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Исследования *in vitro* для определения влияния РМ01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы легкого

Целью данного исследования было определение способности РМ01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения карциномы легкого.

Следующие агенты оценивали в комбинации с РМ01183: оксалиплатин, карmustин, циклофосфамид, митомицин С (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил (5-FU), гемцитабин, паклитаксел, доцетаксел, винкристин, даунорубицин, актиномицин D, топотекан, этопозид, бортезомиб, вориностат, дакарбазин, темсиролимус, эрлотиниб, ЕТ-743 и РМ00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия карциномы легкого А549. Клетки А549 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на клетках А549 после 72 часов воздействия лекарственного средства. Кратко, клетки собирали и засевали на 96-луночные микротитрационные планшеты с плотностью 5000 клеток в 150 мкл культуральной среды и инкубировали в течение 24 часов в среде, не содержащей лекарственного средства, до обработки только носителем или испытуемыми соединениями в течение 72 часов.

Цитотоксический эффект измеряли анализом восстановления МТТ, в котором использовали бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, тетразол,

который восстанавливается до пурпурного формазана в митохондриях живых клеток. МТТ (50 мкл 1 мг/мл маточного раствора) добавляли в лунки и инкубировали в течение 8 часов при 37°C до образования кристаллов формазана. После осторожного удаления культуральной среды добавляли DMSO для растворения нерастворимого пурпурного формазана с получением окрашенного раствора. Спектральную поглощательную способность лунок оценивали количественно измерением оптической плотности на 540 нм. Результаты выражали в процентных долях от контрольного клеточного роста. Величины IC₅₀ (концентрацию лекарственного средства, которая вызывает 50% ингибирование клеточного роста), использовавшиеся для исследований комбинаций, рассчитывали с использованием компьютерной программы Prism v5.02 (GraphPad). Результаты выражали как молярную концентрацию и представляли среднюю величину от 2-4 независимых анализов.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии A549 представлены в таблице 1.

Таблица 1
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (М) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)
PM01183	3,60E-09	Оксалиплатин	9,00E-04	5-FU	9,23E-05
Гемцитабин	2,80E-10	Паклитаксел	4,00E-08	Доцетаксел	3,00E-09
Винкристин	2,50E-07	Даунорубицин	3,55E-07	Митомицин С	2,49E-04
Актиномицин D	4,70E-09	Топотекан	8,00E-07	Этопозид	7,82E-07
Бортезомиб	3,10E-09	Вориностат	6,81E-06	Циклофосфамид	1,00E-03
Кармустин	1,00E-03	Дакарбазин	6,00E-04	Темсиролимус	3,29E-06
Эрлотиниб	1,00E-05	ET-743	2,25E-08	PM00104	7,00E-09

b. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки A549 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше. Ранее полученные величины IC₅₀ использовали в качестве исходных концентраций для каждого соединения (100% концентрация). Произвольные разведения как процентные доли от исходной величины IC₅₀ (100%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25% и 0%) осуществляли для каждой пары соединений и тестировали в объединенных комплементарных (противоположные концентрации) кривых доза-ответ следующим образом:

IC ₅₀ PM01183	IC ₅₀ агента
100%	0%
75%	25%
70%	30%
60%	40%
50%	50%
40%	60%
30%	70%
25%	75%
0%	100%

В качестве визуального средства величины ответов наносили на график рассеяния с соотношениями доз по оси х и % ответа по оси у. Горизонтальная линия была проведена между двумя конечными величинами ответа (например, между величинами ответа для 100% IC₅₀ PM01183 и 100% IC₅₀ стандартного химиотерапевтического агента).

В случаях, когда величины ответа в двух конечных точках были приблизительно эквивалентными, точки, лежавшие выше или ниже указанной расчетной линии аддитивности, можно было интерпретировать как представляющие антагонистическое

или синергическое взаимодействие лекарственных средств соответственно.

In vitro комбинации каждого лекарственного средства с PM01183 обладают потенциалом синергизма, аддитивности или антагонизма. Синергическая цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам представляет собой оптимальный 5 эффект и подразумевает, что комбинация PM01183 с другим лекарственным средством является более эффективной, чем каждое из лекарственных средств по отдельности.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии карциномы легкого A549:

а. Комбинация PM01183 с оксалиплатином продемонстрировала сильный синергизм

10 (фигура 1).

б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 2) и PM01183 с гемцитабином (фигура 3) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

в. Комбинация PM01183 с паклитакселом показала синергизм (фигура 4) при соотношениях доз 50/50-40/60, в то время как комбинация PM01183 с доцетакселом 15 показала синергизм (фигура 5) при соотношениях доз 75/25 и 50/50, а комбинация PM01183 с винкристином (фигура 6) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

г. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 7), PM01183 с митомицином С (фигура 8) и PM01183 с актиномицином D (фигура 9) показала синергизм почти при 20 всех соотношениях доз.

д. Комбинация PM01183 с топотеканом показала сильный синергизм (фигура 10), в то время как комбинация PM01183 с этопозидом показала синергизм (фигура 11) при соотношениях доз 60/40 и 25/75.

е. Комбинация PM01183 с бортезомибом показала синергизм (фигура 12) при

25 соотношениях доз 40/60-30/70.

ж. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 13) показала сильный синергизм почти при всех соотношениях доз.

з. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 14) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

и. Комбинация PM01183 с кармустином показала сильный синергизм (фигура 15).

ж. Комбинация PM01183 с дакарбазином показала сильный синергизм (фигура 16).

к. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала синергизм (фигура 17) почти при всех соотношениях доз.

л. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала сильный синергизм (фигура 18).

м. Комбинация PM01183 с ET-743 показала синергизм (фигура 19) при соотношениях доз 75/25-60/40 и 30/70.

н. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 20) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

ПРИМЕР 2. Исследования in vitro для определения влияния PM01183 в комбинации

40 с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии саркомы

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения саркомы.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин,

45 циклофосфамид, митомицин С (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), гемцитабин, доцетаксел, винкристин, винорелбин, даунорубицин, цитарабин, актиномицин D, топотекан, этопозид, вориностат, дакарбазин, темсиролимус, эрлотиниб, аплидин, PM02734, ET-

743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4X концентрации. В лунки добавляли аликвоты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

5 Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия рабдомиосаркомы A673. Клетки A673 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

10 Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии A673 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

15 Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии A673 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 2.

Таблица 2
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,20E-09	Цисплатин	3,03E-05	Оксалиплатин	7,80E-05
Цитарабин	1,97E-07	Гемцитабин	4,34E-10	Доцетаксел	6,50E-10
Винкристин	8,60E-09	Винорелбин	5,00E-08	Даунорубицин	5,20E-07
Митомицин С	2,99E-06	Актиномицин D	9,56E-10	Топотекан	2,40E-08
Этопозид	1,55E-06	Вориностат	2,16E-06	Циклофосфамид	1,00E-03
Дакарбазин	3,00E-04	Темсиролимус	1,00E-06	Эрлотиниб	5,00E-05
Аплидин	2,16E-09	ET-743	1,90E-09	PM02734	3,60E-06
PM00104	3,00E-09				

30 б. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки A673 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

35 Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии саркомы A673:

а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 21) и PM01183 с оксалиплатином (фигура 22) продемонстрировала сильный синергизм.

40 б. Комбинация PM01183 с цитарабином продемонстрировала сильный синергизм (фигура 23), в то время как комбинация PM01183 с гемцитабином показала синергизм (фигура 24) при соотношениях доз 75/25-70/30.

45 в. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 25), PM01183 с винкристином (фигура 26) и PM01183 с винорелбином (фигура 27) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

г. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 28) и PM01183 с актиномицином D (фигура 30) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с митомицином С (фигура 29) показала сильный синергизм.

е. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 31) и PM01183 с этопозидом (фигура 32) показала сильный синергизм почти при всех соотношениях доз.

- f. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 33) показала сильный синергизм
g. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 34) показала синергизм почти
при всех соотношениях доз.
h. Комбинация PM01183 с дакарбазином показала синергизм (фигура 35) при
5 соотношениях доз 75/25-70/30 и 40/60.
i. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура 36).
j. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала сильный синергизм (фигура 37).
k. Комбинация PM01183 с аплидином показала синергизм (фигура 38) при
соотношениях доз 50/50-30/70.
10 l. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 39) показала синергизм при соотношениях
доз 30/70-25/75.
m. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 40) показала синергизм при
соотношениях доз 75/25 и 40/60.
n. Комбинация PM01183 с PM00104 показала синергизм (фигура 41).

15 ПРИМЕР 3. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации
с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии злокачественной
меланомы

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать
противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для
20 лечения злокачественной меланомы.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, митомицин С
(маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной
дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, доксорубицин, даунорубицин,
цитарабин, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, дакарбазин, темсиролимус,
25 PM02734, ET-743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали
в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения
осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4X
концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия меланомы
30 SK-MEL-2. Клетки SK-MEL-2 культивировали в минимальной эссенциальной среде
Игла (MEME) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-
глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95%
влажности

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:
35 а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого
лекарственного средства на опухолевой клеточной линии SK-MEL-2 после 72 часов
воздействия лекарственного средства.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного
40 агента для опухолевой клеточной линии SK-MEL-2 рассчитаны по той же методике,
которая описана в примере 1, и представлены в таблице 3.

Таблица 3
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,00E-09	Цисплатин	1,60E-04	5-FU	7,00E-04
Цитарабин	3,89E-06	Метотрексат	1,00E-04	Даунорубицин	1,77E-07
Доксорубицин	3,00E-07	Митомицин С	9,00E-07	Топотекан	4,37E-07
Иринотекан	1,80E-05	Этопозид	2,89E-06	Дакарбазин	6,30E-04
Темсиролимус	5,00E-05	ET-743	2,00E-09	PM02734	1,76E-06

PM00104	2,00E-09			
---------	----------	--	--	--

b. Во второй серии исследований опухолевые клетки SK-MEL-2 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

5 Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

10 Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии меланомы SK-MEL-2:

10 a. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 42) показала синергизм при соотношениях доз 75/25, 50/50 и 30/70.

15 b. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 43), PM01183 с цитарабином (фигура 44) и PM01183 с метотрексатом (фигура 45) продемонстрировала сильный синергизм.

c. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 46) и PM01183 с доксорубицином (фигура 47) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с митомицином С (фигура 48) показала сильный синергизм.

20 d. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 49), PM01183 с иринотеканом (фигура 50) и PM01183 с этопозидом (фигура 51) показала синергизм и даже сильный синергизм при нескольких соотношениях доз.

25 e. Комбинация PM01183 с дакарбазином показала синергизм (фигура 52).

f. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура 53).

g. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 54) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

30 h. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 55) показала синергизм при соотношениях доз 25/75-50/50.

i. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 56) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

35 ПРИМЕР 4. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы предстательной железы

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения рака предстательной железы.

35 Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин, митомицин С (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, доцетаксел, паклитаксел, винорелбин, даунорубицин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, вориностат, темсиролимус, бортезомиб, эрлотиниб, флютамид, PM02734, ET-743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликвоты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

45 Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия аденокарциномы предстательной железы PC-3. Клетки PC-3 культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки

(FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого

5 лекарственного средства на опухолевой клеточной линии PC-3 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

10 Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии PC-3 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 4.

Таблица 4
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,60E-09	Цисплатин	1,10E-04	Оксалиплатин	1,71E-04
5-FU	1,00E-03	Цитарабин	4,00E-05	Гемцитабин	4,00E-07
Метотрексат	1,20E-04	Доцетаксел	1,86E-08	Паклитаксел	9,00E-08
Винорелбин	1,00E-05	Даунорубицин	1,15E-06	Доксорубицин	1,48E-06
Митомицин С	1,00E-05	Актиномицин D	1,00E-08	Топотекан	6,33E-07
Иринотекан	7,00E-05	Этопозид	4,80E-05	Бортезомиб	8,00E-07
Вориностат	3,90E-06	Флутамид	4,90E-05	Темсиролимус	5,00E-07
Эрлотиниб	2,33E-04	ET-743	8,00E-09	PM02734	5,40E-07
PM00104	7,10E-09				

b. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки PC-3 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

25 Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии рака предстательной железы PC-3:

30 а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 57) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с оксалиплатином (фигура 58) продемонстрировала сильный синергизм.

35 б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 59) и PM01183 с цитарабином (фигура 60) продемонстрировала синергизм почти при всех соотношениях доз, а комбинация PM01183 с гемцитабином показала сильный синергизм (фигура 61). И,

наконец, комбинация PM01183 с метотрексатом показала синергизм (фигура 62) при соотношениях доз 30/70-25/75.

40 в. Комбинация PM01183 с доцетакселом показала синергизм (фигура 63) почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с паклитакселом (фигура 64) показала синергизм при соотношениях доз 40/60-30/70. Комбинация PM01183 с

винорелбином (фигура 65) показала сильный синергизм.

45 г. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 66) и PM01183 с доксорубицином (фигура 67) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 с митомицином С (фигура 68) и PM01183 с актиномицином D (фигура 69) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

д. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 70) и PM01183 с иринотеканом (фигура 71) показала сильный синергизм, в то время как комбинация PM01183 с этопозидом (фигура 72) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

f. Комбинация PM01183 с бортезомибом (фигура 73) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

g. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 74) показала синергизм.

5 h. Комбинация PM01183 с флутамидом (фигура 75) показала синергизм при соотношениях доз 40/60-25/75.

i. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура 76).

j. Комбинация PM01183 с эрлотинибом (фигура 77) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

10 k. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 78) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

l. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 79) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-70/30 и 30/70.

m. Комбинация PM01183 с PM00104 показала сильный синергизм (фигура 80).

15 ПРИМЕР 5. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы поджелудочной железы

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения карциномы поджелудочной железы.

20 Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), гемцитабин, даунорубицин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, вориностат, темсиролимус, бортезомиб, эрлотиниб, PM02734, ET-743 и PM00104 (маточные растворы 25 указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C).

Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

30 Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия карциномы поджелудочной железы PANC-1. Клетки PANC-1 культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

35 а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии PANC-1 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

40 Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии PANC-1 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 5.

Таблица 5
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,80E-09	Цисплатин	1,47E-04	Оксалиплатин	1,84E-04
Цитарабин	9,00E-05	Гемцитабин	1,00E-06	Метотрексат	1,00E-05
Даунорубицин	8,69E-07	Доксорубицин	3,45E-06	Актиномицин D	2,20E-08
Топотекан	4,37E-06	Иринотекан	9,00E-05	Этопозид	1,00E-05
Бортезомиб	4,16E-07	Вориностат	6,05E-06	Темсиролимус	1,00E-05

Эрлотиниб	4,16E-07	ET-743	2,10E-08	PM02734	9,00E-06
PM00104	7,89E-09				

b. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки PANC-1 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии рака поджелудочной железы PANC-1:

a. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 81) и PM01183 с оксалиплатином (фигура 82) продемонстрировала сильный синергизм.

b. Комбинация PM01183 с цитарабином (фигура 83) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с гемцитабином (фигура 84) и PM01183 с метотрексатом (фигура 85) показала сильный синергизм.

c. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 86) и PM01183 с доксорубицином (фигура 87) показала синергизм, в то время как комбинация PM01183 с актиномицином D (фигура 88) показала синергизм при соотношениях доз 75/25 и 30/70-25/75.

d. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 89) и PM01183 с иринотеканом (фигура 90) показала сильный синергизм, в то время как комбинация PM01183 с этопозидом (фигура 91) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

e. Комбинация PM01183 с бортезомибом (фигура 92) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-70/30 и 50/50.

f. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 93) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

g. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура 94).

h. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала сильный синергизм (фигура 95).

i. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 96) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

j. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 97) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

k. Комбинация PM01183 с PM00104 показала синергизм (фигура 98) при соотношениях доз 75/25 и 50/50.

ПРИМЕР 6. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы желудка

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения рака желудка.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин, циклофосфамид (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, паклитаксел, винкристин, винорелбин, даунорубицин, дакарбазин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, вориностат, темсиролимус, бортезомиб, эрлотиниб, аплидин, PM02734, ET-743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки

культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия карциномы желудка HGC-27. Клетки HGC-27 культивировали в среде Дульбекко в модификации Исков (IDMD) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии HGC-27 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии HGC-27 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 6.

Таблица 6
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (М) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)
PM01183	8,50E-10	Цисплатин	8,00-E-05	Оксалиплатин	1,06E-04
5-FU	1,00E-05	Цитарабин	5,00E-05	Гемцитабин	5,34E-10
Метотрексат	3,30E-08	Паклитаксел	5,00E-09	Винкристин	1,25E-08
Винорелбин	6,50E-08	Даунорубицин	3,72E-07	Доксорувицин	5,40E-08
Актиномицин D	3,74E-09	Топотекан	8,08E-07	Иринотекан	4,00E-06
Этопозид	2,90E-06	Бортезомиб	5,60E-09	Вориностат	1,20E-06
Циклофосфамид	1,00E-03	Дакарбазин	3,46E-04	Темсиролимус	1,50E-07
Эрлотиниб	7,50E-06	Аплидин	9,00E-09	ЕТ-743	5,80E-09
PM02734	9,50E-07	PM00104	3,20E-09		

б. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки HGC-27 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии карциномы желудка HGC-27:

а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 99) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с оксалиплатином (фигура 100) продемонстрировала сильный синергизм.

б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 101) и PM01183 с цитарабином (фигура 102) продемонстрировала синергизм, иногда даже сильный при тех же самых соотношениях доз. Комбинация PM01183 с гемцитабином (фигура 103) и PM01183 с метотрексатом (фигура 104) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

с. Комбинация PM01183 с паклитакселом показала сильный синергизм (фигура 105). Комбинация PM01183 с винкристином (фигура 106) и PM01183 с винорелбином (фигура 107) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

д. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 108) и PM01183 с актиномицином D (фигура 110) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 доксорувицином (фигура 109) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-60/40.

е. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 71) показала сильный синергизм (фигура 111). Комбинация PM01183 с иринотеканом (фигура 112) показала синергизм

при соотношениях доз 70/30-60/40 и 40/60, в то время как комбинация PM01183 с этопозидом (фигура 113) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

f. Комбинация PM01183 с бортезомибом показала сильный синергизм (фигура 114).

g. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 115) показала синергизм почти при 5 всех соотношениях доз.

h. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом показала сильный синергизм (фигура 116).

i. Комбинация PM01183 с дакарбазином показала сильный синергизм (фигура 117).

j. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура 10 118).

k. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала сильный синергизм (фигура 119).

l. Комбинация PM01183 с аплидином показала сильный синергизм (фигура 120).

m. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 121) показала синергизм при соотношениях доз 50/50 и 75/25.

15 n. Комбинация PM01183 с PM02734 показала сильный синергизм (фигура 122).

o. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 123) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

ПРИМЕР 7. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы яичника

20 Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения рака яичника.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин,

25 циклофосфамид, кармустин, митомицин С (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-

фторурацил, гемцитабин, доцетаксел, паклитаксел, винクリстин, винорелбин, даунорубицин, дакарбазин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, вориностат, темсиролимус, эрлотиниб, аплидин, 30 PM02734, ET-743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4X концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия

35 аденокарциномы яичника IGROV-1. Клетки IGROV-1 культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

40 а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии IGROV-1 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного 45 агента для опухолевой клеточной линии IGROV-1 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 7.

Таблица 7 Величины IC ₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)
PM01183	3,20E-09	Цисплатин	7,00E-05	Оксалиплатин	8,50E-06
5-FU	9,00E-05	Цитарабин	1,17E-05	Гемцитабин	6,34E-09
Метотрексат	1,00E-04	Доцетаксел	5,01E-08	Паклитаксел	9,50E-08
Винкристин	3,79E-07	Винорелбин	1,39E-06	Даунорубицин	3,55E-07
Доксорубицин	2,59E-07	Актиномицин D	3,29E-09	Митомицин С	3,00E-06
Топотекан	3,00E-07	Иринотекан	1,00E-05	Этопозид	3,06E-06
Вориностат	2,88E-06	Кармустин	7,12E-04	Циклофосфамид	1,00E-03
Дакарбазин	3,98E-04	Темсиролимус	1,27E-07	Эрлотиниб	7,91E-06
Аплидин	1,50E-09	ET-743	6,45E-09	PM02734	3,33E-07
PM00104	3,30E-09				

5 b. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки IGROV-1 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

10 Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

15 Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии карциномы яичника IGROV-1:

20 а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 124) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с оксалиплатином продемонстрировала сильный синергизм (фигура 125).

25 б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 126) и PM01183 с цитарабином (фигура 127) продемонстрировала синергизм почти при всех соотношениях доз.

30 Комбинация PM01183 с гемцитабином (фигура 128) и PM01183 с метотрексатом (фигура 129) показала синергизм.

35 в. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 130), PM01183 с паклитакселом (фигура 131) и PM01183 с винкристином (фигура 132) показала сильный синергизм, в то время как комбинация PM01183 с винорелбином (фигура 133) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

40 г. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 134) показала синергизм.

45 Комбинация PM01183 с доксорубицином (фигура 135) и PM01183 с актиномицином D (фигура 136) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с митомицином С (фигура 137) показала синергизм при соотношениях доз 50/50 и 30/70-25/75.

50 д. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 138), PM01183 с иринотеканом (фигура 139) и PM01183 с этопозидом (фигура 140) показала синергизм.

55 е. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 114) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

60 ж. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 142) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

65 з. Комбинация PM01183 с кармустином (фигура 143) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

70 и. Комбинация PM01183 с дакарбазином (фигура 144) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

75 к. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала синергизм (фигура 145).

80 л. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала синергизм (фигура 146).

85 м. Комбинация PM01183 с аплидином (фигура 147) показала синергизм при соотношениях доз 70/30-60/40.

т. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 148) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-60/40.

н. Комбинация PM01183 с PM02734 показала сильный синергизм (фигура 149).

о. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 150) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

ПРИМЕР 8. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии печеночно-клеточной карциномы

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения печеночно-клеточного рака.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин, циклофосфамид (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, паклитаксел, доцетаксел, винクリстин, винорелбин, даунорубицин, цитаребин, доксорубицин, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, бортезомиб, эрлотиниб, ET-743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия печеночно-клеточной карциномы HepG2. Клетки HepG2 культивировали в минимальной эссенциальной среде Игла (MEME) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии HepG2 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии HepG2 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 8.

Таблица 8
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
PM01183	2,50E-09	Цисплатин	5,00E-05	Оксалиплатин	2,80E-05
5-FU	4,50E-06	Цитаребин	2,06E-05	Гемцитабин	5,34E-09
Метотрексат	3,96E-08	Доцетаксел	5,00E-07	Паклитаксел	5,70E-08
Винкристин	6,00E-08	Винорелбин	1,02E-06	Даунорубицин	3,00E-07
Доксорубицин	2,00E-07	Топотекан	1,00E-06	Иринотекан	1,00E-06
Этопозид	1,04E-05	Бортезомиб	3,90E-07	Циклофосфамид	1,00E-03
Эрлотиниб	8,60E-06	ET-743	7,21E-09	PM00104	3,00E-09

б. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки HepG2 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии печеночно-клеточного рака НерG2:

а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 151) и PM01183 с оксалиплатином (фигура 152) продемонстрировала сильный синергизм.

5 б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 153) показала синергизм при соотношениях доз 75/25, 50/50 и 30/70. Комбинация PM01183 с цитарабином (фигура 154), PM01183 с гемцитабином (фигура 155) и PM01183 с метотрексатом (фигура 156) показала сильный синергизм.

с. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 157) показала сильный синергизм.

10 Комбинация PM01183 с паклитакселом (фигура 158) и PM01183 с винкристином (фигура 159) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с винорелбином (фигура 160) показала синергизм при соотношениях доз 50/50 и 30/70-25/75.

15 д. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 161) и PM01183 с доксорубицином (фигура 162) показала почти при всех соотношениях доз.

е. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 163) и PM01183 с этопозидом (фигура 165) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 с иринотеканом (фигура 164) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

19 ф. Комбинация PM01183 с бортезомибом (фигура 166) показала синергизм при

20 соотношениях доз 75/25-60/40.

г. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 167) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

h. Комбинация PM01183 с эрлотинибом (фигура 168) показала сильный синергизм.

i. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 169) показала сильный синергизм при

25 соотношениях доз 60/40-50/50.

j. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 170) показала сильный синергизм.

ПРИМЕР 9. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы молочной железы

30 Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения рака молочной железы.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин, 35 циклофосфамид, карmustин, митомицин С (маточные растворы указанных соединений

изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, паклитаксел, доцетаксел, винкристин, винорелбин, даунорубицин, дакарбазин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, вориностат, темсиролимус, эрлотиниб, тамоксифен, PM02734, ET-743 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали

40 в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликвоты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия 45 adenокарциномы молочной железы MDA-MB-231. Клетки MDA-MB-231 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии MDA-MB-231 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

5 Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии MDA-MB-231 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 9.

Таблица 9 Величины IC ₅₀ в молярной концентрации (М) для каждого агента						
	Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)
10	PM01183	3,50E-09	Цисплатин	1,53E-04	Оксалиплатин	1,08E-04
	5-FU	9,00E-05	Цитарабин	9,57E-06	Гемцитабин	8,50E-09
15	Метотрексат	5,94E-06	Доцетаксел	2,50E-09	Паклитаксел	8,50E-09
	Винкристин	5,00E-08	Винорелбин	1,20E-05	Даунорубицин	3,70E-07
	Доксорубицин	6,00E-07	Актиномицин D	4,54E-10	Митомицин С	2,00E-06
	Топотекан	1,66E-07	Иринотекан	8,50E-06	Этопозид	4,80E-06
	Вориностат	1,70E-06	Циклофосфамид	1,00E-03	Кармустин	9,00E-04
	Дакарбазин	1,92E-05	Тамоксифен	1,30E-05	Темсиролимус	1,20E-05
	Эрлотиниб	1,00E-04	ET-743	2,00E-09	PM02734	2,80E-06
	PM00104	1,00E-09				

20 б. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки MDA-MB-231 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

25 Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии карциномы молочной железы MDA-MB-231:

а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 171) и PM01183 с оксалиплатином (фигура 172) показала сильный синергизм.

30 б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 173) продемонстрировала синергизм почти при всех соотношениях доз. Комбинация PM01183 с цитарабином (фигура 174) и PM01183 с гемцитабином (фигура 175) показала сильный синергизм, в то время как комбинация PM01183 с метотрексатом (фигура 176) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-70/30 и 50/50.

35 в. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 177) и PM01183 с паклитакселом (фигура 178) показала синергизм. Комбинация PM01183 с винкристином (фигура 179) показала синергизм при соотношениях доз 75/25 и 50/50, в то время как комбинация PM01183 с винорелбином (фигура 180) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

40 г. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 181) и PM01183 с митомицином С (фигура 184) показала синергизм почти при всех соотношениях доз. Комбинация PM01183 с доксорубицином (фигура 182) показала сильный синергизм, а комбинация PM01183 с актиномицином D (фигура 183) показала синергизм.

45 д. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 185) показала синергизм почти при всех соотношениях доз. Комбинация PM01183 с иринотеканом (фигура 186) и PM01183 с этопозидом (фигура 187) показала синергизм.

е. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 188) показала синергизм при соотношениях доз 75/25 и 50/50-40/60,

g. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 189) показала сильный синергизм.

h. Комбинация PM01183 с кармустином (фигура 190) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

5 i. Комбинация PM01183 с дакарбазином (фигура 191) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

j. Комбинация PM01183 с тамоксифеном (фигура 192) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

k. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура

10 193).

l. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала сильный синергизм (фигура 194).

m. Комбинация PM01183 с ET-743 показала сильный синергизм (фигура 195).

n. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 196) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

15 o. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 197) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

ПРИМЕР 10. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии колоректальной карциномы

20 Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения колоректального рака.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин,

25 циклофосфамид, митомицин С (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, доцетаксел, винорелбин, даунорубицин, дакарбазин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, этопозид, вориностат, бортезомиб, темсиролимус, эрлотиниб, PM02734 и аплидин (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные

30 серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия аденокарциномы толстой кишки HT-29. Клетки HT-29 культивировали в среде Игла в 35 модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

40 а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии HT-29 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии HT-29 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 10.

Таблица 10
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
------------	----------------------	------------	----------------------	------------	----------------------

PM01183	3,70E-09	Цисплатин	2,20E-04	Оксалиплатин	1,03E-04
5-FU	9,00E-06	Цитарабин	7,80E-06	Гемцитабин	4,00E-07
Доцетаксел	3,20E-10	Винорелбин	3,00E-08	Даунорубицин	5,32E-07
Доксорубицин	9,00E-07	Актиномицин D	3,27E-09	Митомицин C	2,00E-06
Топотекан	3,28E-07	Иринотекан	9,00E-06	Этопозид	5,44E-06
Бортезомиб	6,15E-09	Вориностат	2,76E-06	Циклофосфамид	1,00E-03
Дакарбазин	2,47E-05	Темсиролимус	3,50E-06	Эрлотиниб	2,56E-05
Аплидин	1,76E-09	Pm02734	2,14E-07		

5 б. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки НТ-29 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

10 Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

15 Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии колоректальной карциномы НТ-29:

а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 198) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-70/30, в то время как комбинация PM01183 с оксалиплатином (фигура 199) продемонстрировала сильный синергизм.

20 б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 200) и PM01183 с гемцитабином (фигура 202) продемонстрировала синергизм почти при всех соотношениях доз, а комбинация PM01183 с цитарабином (фигура 201) показала сильный синергизм.

25 в. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 203) показала синергизм при соотношениях доз 50/50 и 75/25, в то время как комбинация PM01183 с винорелбином (фигура 204) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

25 д. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 205) и PM01183 с митомицином С (фигура 208) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 с доксорубицином (фигура 206) и PM01183 с актиномицином D (фигура 207) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

30 е. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 209) и PM01183 с этопозидом (фигура 211) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 с иринотеканом (фигура 210) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

35 ф. Комбинация PM01183 с бортезомибом (фигура 212) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

35 г. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 213) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

40 х. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 214) показала синергизм при соотношениях доз 40/60-25/75.

и. Комбинация PM01183 с дакарбазином (фигура 215) показала сильный синергизм.

40 ж. Комбинация PM01183 с темсиролимусом показала сильный синергизм (фигура 216).

к. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала синергизм почти при всех соотношениях доз (фигура 217).

л. Комбинация PM01183 с аплидином (фигура 218) показала синергизм при соотношениях доз 40/60-25/75.

45 м. Комбинация PM01183 с Pm02734 (фигура 219) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

ПРИМЕР 11. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии карциномы почки

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения рака почки.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, циклофосфамид, митомицин С (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, метотрексат, доцетаксел, винкристин, винорелбин, даунорубицин, дакарбазин, цитарабин, доксорубицин, актиномицин D, топотекан, иринотекан, этопозид, вориностат, эрлотиниб, PM02734, ET-743, PM00104 и аплидин (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовоты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия карциномы почки RXF-393. Клетки RXF-393 культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого лекарственного средства на опухолевой клеточной линии RXF-393 после 72 часов воздействия лекарственного средства.

Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии RXF-393 рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 11.

Таблица 11
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)	Соединение	IC ₅₀ (M)
PM01183	5,00E-09	Цисплатин	6,67E-05	5-FU	3,00E-04
Цитарабин	5,00E-05	Гемцитабин	5,00E-07	Метотрексат	1,75E-04
Доцетаксел	5,94E-10	Винкристин	1,73E-08	Винорелбин	8,50E-06
Даунорубицин	6,20E-07	Доксорубицин	8,00E-07	Актиномицин D	7,09E-10
Митомицин С	9,00E-06	Топотекан	3,93E-07	Иринотекан	1,40E-05
Этопозид	2,00E-05	Вориностат	4,10E-06	Циклофосфамид	1,00E-03
Дакарбазин	7,94E-04	Эрлотиниб	4,80E-06	Аплидин	1,50E-09
ET-743	9,60E-09	PM02734	5,00E-06	PM00104	5,40E-09

б. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки RXF-393 инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии карциномы почки RXF-393:

а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 220) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 221), PM01183 с цитарабином (фигура 222), PM01183 с гемцитабином (фигура 223) и PM01183 с метотрексатом (фигура 224) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

с. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 225), PM01183 с винкристином (фигура 226) и PM01183 с винорелбином (фигура 227) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

d. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 228) показала синергизм почти

5 при всех соотношениях доз. Комбинация PM01183 с доксорубицином (фигура 229) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-60/40, в то время как комбинация PM01183 с актиномицином D (фигура 230) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-70/30 и 30/70. Комбинация PM01183 с митомицином С (фигура 231) показала сильный синергизм.

10 е. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 232) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 с иринотеканом (фигура 233) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с этопозидом (фигура 234) показала синергизм при соотношениях доз 75/25 и 40/60-30/70.

15 f. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 235) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

g. Комбинация PM01183 с циклофосфамидом (фигура 236) показала синергизм при соотношениях доз 75/25-70/30 и 25/75.

h. Комбинация PM01183 с дакарбазином (фигура 237) показала синергизм при соотношениях доз 60/40-50/50.

20 i. Комбинация PM01183 с эрлотинибом показала сильный синергизм (фигура 238).

j. Комбинация PM01183 с аплидином (фигура 239) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

k. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 240) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

25 l. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 241) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

m. Комбинация PM01183 с PM00104 (фигура 242) показала сильный синергизм.

ПРИМЕР 12. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии глиобластомы

30 Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических агентов, используемых для лечения глиобластомы.

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: цисплатин, оксалиплатин (маточные растворы указанных соединений изготавливали в стерильной воде двойной 35 дистилляции и хранили при -20°C), 5-фторурацил, гемцитабин, доцетаксел, винкристин, даунорубицин, дакарбазин, доксорубицин, топотекан, иринотекан, метотрексат, этопозид, вориностат, темсиролимус, бортезомиб, эрлотиниб, PM02734, ET-743 и аплидин (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные разведения осуществляли не содержащей 40 сыворотки культуральной средой до конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликвоты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования была выбрана человеческая клеточная линия глиобластомы U87-MG. Клетки U87-MG культивировали в минимальной эссенциальной среде Игла (MEME) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-45 глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 1:

а. В первой серии исследований величины IC₅₀ определяли для каждого

лекарственного средства на опухолевой клеточной линии U87-MG после 72 часов воздействия лекарственного средства.

5 Величины IC₅₀ (72 часа воздействия лекарственного средства) каждого отдельного агента для опухолевой клеточной линии U87-MG рассчитаны по той же методике, которая описана в примере 1, и представлены в таблице 12.

Таблица 12
Величины IC₅₀ в молярной концентрации (М) для каждого агента

Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)	Соединение	IC ₅₀ (М)
PM01183	4,50E-09	Цисплатин	4,40E-05	Оксалиплатин	1,90E-04
5-FU	1,00E-03	Гемцитабин	4,50E-07	Метотрексат	5,00E-05
Доцетаксел	1,00E-07	Винкристин	1,00E-07	Даунорубицин	2,84E-07
Доксорубицин	3,00E-07	Топотекан	7,50E-07	Иринотекан	7,54E-06
Этопозид	1,85E-05	Бортезомиб	4,00E-07	Вориностат	1,60E-05
Дакарбазин	7,00E-04	Темсиролимус	3,50E-06	Эрлотиниб	1,49E-04
Аплидин	3,80E-09	ET-743	5,00E-09	PM02734	4,08E-06

15 b. Во второй серии исследований человеческие опухолевые клетки U87-MG инкубировали с PM01183 в комбинации с каждым из агентов, указанных выше, в той же комбинации уникальных концентраций IC₅₀, как описано в примере 1.

20 Культивирование клеток и засевание клеток на планшеты осуществляли, как описано ранее, и цитотоксический эффект измеряли с использованием анализа МТТ, как описано в примере 1.

Согласно данному исследованию было установлено, что в отношении человеческой клеточной линии глиобластомы U87-MG:

25 а. Комбинация PM01183 с цисплатином (фигура 243) показала синергизм при соотношениях доз 70/30 и 50/50, в то время как комбинация PM01183 с оксалиплатином (фигура 244) продемонстрировала сильный синергизм.

б. Комбинация PM01183 с 5-фторурацилом (фигура 245) и PM01183 с метотрексатом (фигура 247) показала синергизм. Комбинация PM01183 с гемцитабином (фигура 246) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

30 в. Комбинация PM01183 с доцетакселом (фигура 248) и PM01183 с винкристином (фигура 249) показала сильный синергизм.

г. Комбинация PM01183 с даунорубицином (фигура 250) показала синергизм почти при всех соотношениях доз, в то время как комбинация PM01183 с доксорубицином (фигура 251) показала синергизм при соотношениях доз 75/25 и 60/40.

35 д. Комбинация PM01183 с топотеканом (фигура 252) и PM01183 с этопозидом (фигура 254) показала сильный синергизм. Комбинация PM01183 с иринотеканом (фигура 253) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

е. Комбинация PM01183 с бортезомибом (фигура 255) показала синергизм почти при всех соотношениях доз.

40 ж. Комбинация PM01183 с вориностатом (фигура 256) показала сильный синергизм.

з. Комбинация PM01183 с дакарбазином (фигура 257) показала синергизм.

и. Комбинация PM01183 с темсиролимусом (фигура 258) показала синергизм при соотношениях доз 50/50 и 30/70.

45 ж. Комбинация PM01183 с эрлотинибом (фигура 259) показала синергизм при соотношениях доз 40/60-25/75.

к. Комбинация PM01183 с аплидином (фигура 260) показала синергизм при соотношениях доз 50/50-25/75.

л. Комбинация PM01183 с ET-743 (фигура 261) показала сильный синергизм.

т. Комбинация PM01183 с PM02734 (фигура 262) показала сильный синергизм.

ПРИМЕР 13. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с паклитакселом, винорелбином и доксорубицином на человеческие ксенотрансплантаты опухоли яичника

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность паклитаксела, винорелбина и доксорубицина с использованием ксенотрансплантата человеческой карциномы яичника.

Для всех экспериментов использовали самок бестимусных мышей (Harlan Laboratories Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием суспензии опухолевых клеток.

Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию A2780, которая была получена из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC № 93112519).

Клетки A2780 выращивали при 37°C с 5% CO₂ на среде RPMI-1640. Каждому животному на правом боку подкожно имплантировали 1x10⁷ клеток A2780 с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G (из *in vitro* пассажа 5 в исследовании PM01183 и доксорубицина и PM01183 и винорелбина и из пассажа 9 в исследовании PM01183 и паклитаксела), в 0,05 мл суспензии 50% Matrigel и 50% не содержащей сыворотки среды без антибиотиков.

Измерения размеров опухоли осуществляли с использованием штангенциркуля с цифровой индикацией (Fowler Sylvac, S235PAT). Для оценки объема опухоли (мм³) по 2-мерным измерениям опухоли использовали формулу для расчета объема сжатого эллипсоида: объем опухоли (мм³)=[L×W²]/2, где L представляет собой длину, и она является самым длинным диаметром в мм, а W представляет собой ширину, и она является самым коротким диаметром опухоли в мм. Принимая во внимание единицу плотности, объем опухоли конвертировали в массу (т.е. 1 мм³=1 мг). Объем опухоли и массу тела животных измеряли 2-3 раза в неделю, начиная с первого дня лечения (день 0).

Переносимость лечения оценивали путем мониторинга эволюции массы тела, клинических признаков, а также свидетельств локального повреждения в месте инъекции.

Когда опухоли достигали объема приблизительно 195 мм³ в исследовании PM01183 с паклитакселом, объема приблизительно 158 мм³ в исследовании PM01183 с винорелбином и объема приблизительно 163,5 мм³ в исследовании PM01183 с доксорубицином, мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля (N=5-7 на группу) на основании массы тела и измерений объема опухоли с использованием компьютерной программы NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

PM01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком PM01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 мг/мл. Маточный раствор PM01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Доксорубицин поставлялся в форме твердого порошка, содержащего доксорубицин HCl, который повторно растворяли в физиологическом растворе. Винорелбин поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением

продукта физиологическим раствором. Паклитаксел поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением продукта 5% раствором глюкозы для инъекций до требующейся конечной концентрации.

В указанных экспериментах лечение PM01183 и паклитакселом, PM01183 и

5 винорелбином и PM01183 и доксорубицином, а также плацебо осуществляли путем внутривенного введения один раз в неделю до 2 недель подряд на день 0 и 7. Группам одного уровня дозы вводили или один агент, или комбинацию.

Сравнение медианы объема опухоли в группах, получавших лечение (T), с медианой объема опухоли в контрольной группе ($T/C \times 100\%$) использовали для оценки

10 противопухолевой эффективности. Кроме того, потенцирование определяли, когда ответ в группе комбинированной терапии был больше, чем лучший ответ наиболее активного агента, введенного в качестве единственного агента (монотерапии) по той же схеме и в той же дозе, которые использовались в комбинированной терапии.

Наконец, индекс комбинирования (CI), который количественно измеряет степень

15 лекарственных взаимодействий, получали из фракций, на которые влияло лечение, Fa (определенный как $1-T/C$) для каждой экспериментальной группы в последний день измерения (день 10 для комбинированного исследования PM01183 и паклитаксела и исследования PM01183 и доксорубицина и день 9 для исследования PM01183 и винорелбина) с использованием принципа медиана-эффект (Chou T.C. Pharmacol. Rev., 2006, 58, 621-681).

20 Таблица 13 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и паклитаксела, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 263 показывает эволюцию объема опухолей A2780 у мышей, получавших плацебо, PM01183, паклитаксел и соответствующие комбинации

25 для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 13

Группа	Доза	Тест-материалы	% T/C на день				
			0	3	5	7	10
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	101,6	68,9	83,1	69,1	52,8
G03	0,135 мг/кг	PM01183	101,2	89,9	99,8	84,5	61,2
G04	0,09 мг/кг	PM01183	94,2	88,5	114,1	103,3	88,0
G05	0,045 мг/кг	PM01183	94,0	91,1	99,6	88,0	73,1
G06	25 мг/кг	Паклитаксел	95,3	49,3	42,9	34,0	19,8
G07	18,75 мг/кг	Паклитаксел	95,0	60,4	43,2	41,5	31,1
G08	12,5 мг/кг	Паклитаксел	96,2	62,5	73,9	62,5	50,8
G09	6,25 мг/кг	Паклитаксел	94,3	60,2	79,7	81,3	59,2
G10	0,18 мг/кг 25мг/кг	PM01183 Паклитаксел	93,3	45,9	28,8	20,9	9,2
G11	0,135 мг/кг 18,75мг/кг	PM01183 Паклитаксел	93,4	40,5	37,1	36,0	22,6
G12	0,09 мг/кг 12,5мг/кг	PM01183 Паклитаксел	96,5	64,3	67,7	73,2	49,0
G13	0,045 мг/кг 6,25 мг/кг	PM01183 Паклитаксел	96,2	78,6	89,1	91,1	77,2

Плацебо: лиофилизованный сухой осадок, содержащий 100 мг сахарозы + 45 дигидрофосфат калия 6,8 мг + фосфорная кислота q.s. до pH 3,8-4,5, который повторно растворяли в 1 мл воды для инфузии.

Таблица 14 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и винорелбина, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 264 показывает эволюцию объема опухолей A2780 у

мышей, получавших плацебо, PM01183, винорелбин и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 14

Группа	Доза	Тест-материалы	% Т/С на день					
			0	2	5	7	9	
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	98,9	101,6	72,2	61,3	62,8	
G03	0,135 мг/кг	PM01183	98,3	105,3	77,2	79,1	78,7	
G04	0,09 мг/кг	PM01183	98,0	88,6	61,2	87,6	94,5	
G05	0,045 мг/кг	PM01183	97,8	107,5	93,6	92,5	97,1	
G06	16,0 мг/кг	Винорелбин	99,0	62,5	20,8	24,5	20,0	
G07	12,0 мг/кг	Винорелбин	97,4	67,2	39,1	43,0	36,1	
G08	8,0 мг/кг	Винорелбин	97,6	79,5	45,0	54,2	47,9	
G09	4,0 мг/кг	Винорелбин	97,2	88,6	69,3	81,7	77,3	
G010	0,18 мг/кг 16,0 мг/кг	PM01183 Винорелбин	97,3	50,1	10,9	10,6	8,6	
G011	0,135 мг/кг 12,0 мг/кг	PM01183 Винорелбин	97,2	74,0	29,6	31,2	26,8	
G012	0,09 мг/кг 8,0 мг/кг	PM01183 Винорелбин	96,8	69,3	48,3	56,5	49,8	
G013	0,045 мг/кг 4,0 мг/кг	PM01183 Винорелбин	97,1	85,6	61,7	74,2	81,6	
Плацебо: как описано в таблице 13								

20

Таблица 15 представляет величины % Т/С, полученные в исследовании PM01183 и доксорубицина, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 265 показывает эволюцию объема опухолей A2780 у мышей, получавших плацебо, PM01183, доксорубицин и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

25

Таблица 15

Группа	Доза	Тест-материалы	% Т/С на день					
			0	3	5	7	9	
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	100,9	70,2	68,5	69,3	62,1	
G03	0,135 мг/кг	PM01183	102,2	82,4	86,6	89,2	82,4	
G04	0,09 мг/кг	PM01183	100,2	93,3	95,2	93,5	87,7	
G05	0,045 мг/кг	PM01183	100,1	98,2	98,6	97,7	90,0	
G06	8,0 мг/кг	Доксорубицин	99,5	60,8	49,8	48,1	39,4	
G07	6,0 мг/кг	Доксорубицин	99,4	71,0	60,3	56,8	54,3	
G08	4,0 мг/кг	Доксорубицин	102,0	82,9	75,1	75,0	68,9	
G09	2,0 мг/кг	Доксорубицин	99,8	91,5	93,1	94,2	86,2	
G10	0,18 мг/кг 8,0 мг/кг	PM01183 Доксорубицин	99,7	47,6	32,6	30,3	21,1	
G11	0,135 мг/кг 6,0 мг/кг	PM01183 Доксорубицин	100,6	67,0	54,9	53,9	44,9	
G12	0,09 мг/кг 4,0 мг/кг	PM01183 Доксорубицин	98,3	74,7	69,0	63,1	64,4	
G13	0,045 мг/кг 2,0 мг/кг	PM01183 Доксорубицин	98,1	83,1	86,6	78,1	79,2	
Плацебо: как описано в таблице 13								

45

В результате описанных исследований было установлено, что:

а. Комбинированное лечение PM01183 и паклитакселом было эффективным в отношении ингибирования роста клеток опухоли яичника A2780, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/С 9,2% и 22,6% (день 10) в двух группах, получавших высокие

дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и паклитаксела давала более низкие значения Т/C, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (паклитаксел в дозах 25 мг/кг и 18,75 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (25 мг/кг паклитаксела + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с паклитакселом в отдельности (25 мг/кг паклитаксела) составляли 28,8 против 42,9 (день 5), 20,9 против 34,0 (день 7) и 9,2 против 19,8 (день 10), а значения ТС (%) комбинации (18,75 мг/кг паклитаксела + 0,135 мг/кг PM01183) по сравнению с паклитакселом в отдельности (18,75 мг/кг паклитаксела) составляли 37,1 против 43,2 (день 5), 36,0 против 41,5 (день 7) и 22,6 против 31,1 (день 10). Таким образом, в случае, когда PM01183 комбинируют с паклитакселом, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация PM01183 и паклитаксела давала величины CI менее 1 (при Fa выше 0,8), что указывает на синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли яичника A2780.

б. Комбинированное лечение PM01183 и винорелбином было эффективным в

отношении ингибирования роста клеток опухоли яичника A2780, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/C 8,6% и 26,8% (день 9) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и винорелбина давала более низкие значения Т/C, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (винорелбин в дозах 16 мг/кг и 12 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (16 мг/кг винорелбина + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с винорелбином в отдельности (16 мг/кг винорелбина) составляли 10,9 против 20,8 (день 5), 10,6 против 24,5 (день 7) и 8,6 против 20,0 (день 9), а значения ТС (%) комбинации (12 мг/кг винорелбина + 0,135 мг/кг PM01183) по сравнению с винорелбином в отдельности (12 мг/кг винорелбина) составляли 29,6 против 39,1 (день 5), 31,2 против 43 (день 7) и 26,8 против 36,1 (день 9). Таким образом, в случае, когда PM01183 комбинируют с винорелбином, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация PM01183 и винорелбина давала величины CI 0,75 (при Fa равном 0,97), что указывает на синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли яичника A2780.

с. Комбинированное лечение PM01183 и доксорубицином было эффективным в

отношении ингибирования роста клеток опухоли яичника A2780, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/C 21,1% и 44,9% (день 10) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и доксорубицина давала более низкие значения Т/C, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (доксорубицин в дозе 8 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (8 мг/кг доксорубицина + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с доксорубицином в отдельности (8 мг/кг доксорубицина) составляли 32,6 против 49,8 (день 5), 30,3 против 48,1 (день 7) и 21,1 против 39,4 (день 10). Таким образом, в случае, когда PM01183 комбинируют с доксорубицином, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация PM01183 и доксорубицина давала величины CI менее 1 (при Fa выше 0,8), что указывает на синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли яичника A2780.

45 ПРИМЕР 14. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с цисплатином и 5-фторурацилом на человеческие ксенотрансплантаты опухоли желудка

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность цисплатина и 5-фторурацила с использованием

ксенотрансплантата человеческой карциномы желудка.

Для всех экспериментов использовали самок бестимусных мышей (Harlan Laboratories Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-
5 23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием суспензии опухолевых клеток.

Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию

10 HGC-27, которая была получена из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC № 94042256).

Клетки HGC-27 выращивали при 37°C с 5% CO₂ на среде Дульбекко в модификации Исков (IDMD). Каждому животному на правом боку подкожно имплантировали 5×10⁶
15 клеток HGC-27 с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G (из *in vitro* пассажа 4 в исследовании PM01183 и цисплатина и из пассажа 6 в исследовании PM01183 и 5-фторурацила), в 0,05 мл суспензии 50% Matrigel и 50% не содержащей сыворотки среды без антибиотиков.

Измерения размеров опухоли и переносимость лечения осуществляли и определяли,
20 как описано в примере 13.

Когда опухоли достигали объема приблизительно 165,5 mm³ в исследовании PM01183 с цисплатином и объема приблизительно 170 mm³ в исследовании PM01183 с 5-фторурацилом, мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля (N=5-7 на группу) на основании массы тела и измерений объема опухоли с
25 использованием компьютерной программы NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

PM01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком PM01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 mg/ml. Маточный раствор PM01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Цисплатин и 5-фторурацил поставлялись в форме растворов, изготовленных разбавлением продукта физиологическим раствором до требующейся конечной концентрации.

В указанных экспериментах лечение PM01183 и цисплатином и PM01183 и 5-фторурацилом, а также плацебо осуществляли путем внутривенного введения один раз в неделю до 2 недель подряд на день 0 и 7. Группам одного уровня дозы вводили или
35 один агент, или комбинацию.

Сравнение медианы объема опухоли в группах, получавших лечение (T), с медианой объема опухоли в контрольной группе (T/C x 100%) использовали для оценки противоопухолевой эффективности. Помимо этого, потенцирование и индекс комбинирования (CI) определяли, как описано в примере 13.

40 Таблица 16 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и цисплатина, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 266 показывает эволюцию объема опухолей HGC-27 у мышей, получавших плацебо, PM01183, цисплатин и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

45 Таблица 16

Группа	Доза	Тест-материалы	% T/C на день						
			0	3	5	7	10	12	14
G01 (Конт-)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-	-

	рольная груп- па)									
5	G02	0,18 мг/кг	PM01183	99,6	65,9	55,6	38,7	33,5	24,3	24,3
	G03	0,135 мг/кг	PM01183	97,9	71,6	59,9	47,8	39,3	37,1	38,3
	G04	0,09 мг/кг	PM01183	98,6	67,5	67,9	66,1	70,2	60,3	65,0
	G05	0,045 мг/кг	PM01183	98,9	85,9	83,1	92,1	76,4	81,6	88,5
	G06	6,0 мг/кг	Цисплатин	97,7	76,1	79,0	75,1	64,4	61,3	72,7
	G07	4,5 мг/кг	Цисплатин	98,5	90,5	94,5	90,2	75,7	73,7	81,1
10	G08	3,0 мг/кг	Цисплатин	99,0	78,6	80,0	78,7	81,3	82,8	85,1
	G09	1,5 мг/кг	Цисплатин	99,3	78,1	78,8	82,6	83,5	86,6	89,9
	G10	0,18 мг/кг 6,0 мг/кг	PM01183 Цисплатин	95,7	55,0	42,4	22,3	12,9	7,6	4,6
	G11	0,135 мг/кг 4,5 мг/кг	PM01183 Цисплатин	99,2	67,7	42,7	28,6	17,3	12,1	9,8
	G12	0,09 мг/кг 3,0 мг/кг	PM01183 Цисплатин	99,9	80,0	64,3	45,7	47,2	42,4	56,7
	G13	0,045 мг/кг 1,5 мг/кг	PM01183 Цисплатин	99,9	93,3	83,0	75,9	69,3	70,3	80,0

15 Плацебо: как описано в примере 13

Таблица 17 представляет величины % Т/С, полученные в исследовании PM01183 и 5-фторурацила, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 267 показывает эволюцию объема опухолей HGC-27 у мышей, получавших плацебо, PM01183, 5-фторурацил и соответствующие комбинации

20 для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 17										
% Т/С на день										
Группа	Доза	Тест-материа- лы	0	2	5	7	9	12	14	
25	G01 (Конт- рольная груп- па)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-	
	G02	0,18 мг/кг	PM01183	99,6	78,6	50,9	43,3	41,0	33,0	29,2
	G03	0,135 мг/кг	PM01183	100,2	81,5	58,7	61,4	60,2	54,6	55,1
	G04	0,09 мг/кг	PM01183	100,6	90,5	87,6	83,4	82,6	76,7	67,7
	G05	0,045 мг/кг	PM01183	99,9	84,3	103,2	104,6	103,5	101,6	85,0
	G06	50,0 мг/кг	5-фторурацил	100,3	81,2	82,3	81,1	75,6	69,6	60,7
30	G07	37,5 мг/кг	5-фторурацил	99,4	86,9	86,9	78,6	73,2	76,7	83,1
	G08	25,0 мг/кг	5-фторурацил	100,6	89,8	97,0	111,4	102,6	93,9	82,8
	G09	12,5 мг/кг	5-фторурацил	100,7	81,7	101,3	102,8	98,6	90,5	83,8
	G10	0,18 мг/кг 50,0 мг/кг	PM01183 5-фторурацил	99,6	73,0	44,2	35,9	31,5	25,3	22,0
	G11	0,135 мг/кг 37,5 мг/кг	PM01183 5-фторурацил	100,8	73,4	63,5	53,1	50,6	42,8	51,1
	G12	0,09 мг/кг 25,0 мг/кг	PM01183 5-фторурацил	99,6	95,8	97,7	98,9	90,0	74,7	69,9
35	G13	0,045 мг/кг 12,5 мг/кг	PM01183 5-фторурацил	99,5	80,6	87,3	88,5	99,3	87,1	84,2

Плацебо: как описано в таблице 13

40

В результате описанных исследований было установлено, что:

a. Комбинированное лечение PM01183 и цисплатином было эффективным в отношении ингибирования роста клеток опухоли желудка HGC-27, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/С 4,6% и 9,8% (день 14) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и цисплатина давала более низкие значения Т/С, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (PM01183 в дозах 0,18 мг/кг и 0,135 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (6 мг/кг цисплатина + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с PM01183 в отдельности (0,18 мг/кг PM01183)

составляли 12,9 против 33,5 (день 10), 7,6 против 24,3 (день 12) и 4,6 против 24,3 (день 14), а значения ТС (%) комбинации (4,5 мг/кг цисплатина + 0,135 мг/кг РМ01183) по сравнению с РМ01183 в отдельности (0,135 мг/кг РМ01183) составляли 17,3 против 39,3 (день 10), 12,1 против 37,1 (день 12) и 9,8 против 38,3 (день 14). Таким образом, в случае, когда РМ01183 комбинируют с цисплатином, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация РМ01183 и цисплатина давала величины СІ менее 1 (при Fa выше 0,8), что указывает на синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли желудка НGC-27.

b. Комбинированное лечение РМ01183 и 5-фторурацилом было эффективным в отношении ингибирования роста клеток опухоли желудка НGC-27, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/С 22,0% и 51,1% (день 14) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация РМ01183 и 5-фторурацила давала более низкие значения Т/С, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (РМ01183 в дозе 0,18 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (50 мг/кг 5-фторурацила + 0,18 мг/кг РМ01183) по сравнению с РМ01183 в отдельности (0,18 мг/кг РМ01183) составляли 35,9 против 43,3 (день 7), 31,5 против 41,0 (день 9), 25,3 против 33,0 (день 12) и 22,0 против 29,2 (день 14). Таким образом, в случае, когда РМ01183 комбинируют с 5-фторурацилом, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация РМ01183 и 5-фторурацила давала величины СІ 0,78 (при Fa равном 0,97), что указывает на умеренный синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли желудка НGC-27.

ПРИМЕР 15. Исследования *in vitro* для определения влияния РМ01183 в комбинации

с гемцитабином на человеческие ксенотрансплантаты опухоли поджелудочной железы

Целью данного исследования было определение способности РМ01183 потенцировать противоопухолевую активность гемцитабина с использованием ксенотрансплантата человеческого рака поджелудочной железы.

Для всех экспериментов использовали самок бестимусных мышей (Harlan Laboratories

Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием супензии опухолевых клеток.

Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию SW1990, которая была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC: CRL-2172TM).

Клетки SW1990 выращивали при 37°C с 5% CO₂ на среде RPMI-1640. Каждому

животному на правом боку подкожно имплантировали 5×10^6 клеток SW1990 с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G, из *in vitro* пассажа 12, в 0,05 мл супензии 50% Matrigel и 50% не содержащей сыворотки среды без антибиотиков.

Измерения размеров опухоли и переносимость лечения осуществляли и определяли, как описано в примере 13.

Когда опухоли достигали объема приблизительно 210 mm³, мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля (N = 5-7 на группу) на основании массы тела и измерений объема опухоли с использованием компьютерной программы

NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

PM01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком PM01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 мг/мл. Маточный раствор PM01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Гемцитабин поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением продукта физиологическом раствором для инъекций до концентрации маточного раствора 40 мг/мл. Маточный раствор гемцитабина далее разводили физиологическом раствором для инъекций до требующейся конечной концентрации.

В указанных экспериментах лечение PM01183 и гемцитабином, а также плацебо осуществляли путем внутривенного введения один раз в неделю до 3 недель подряд на день 0, 7 и 14. Группам одного уровня дозы вводили или один агент, или комбинацию.

Сравнение медианы объема опухоли в группах, получавших лечение (T), с медианой объема опухоли в контрольной группе ($T/C \times 100\%$) использовали для оценки противоопухолевой эффективности. Помимо этого, потенцирование и индекс комбинирования (CI) определяли, как описано в примере 13.

Таблица 18 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и гемцитабина, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 268 показывает эволюцию объема опухолей SW1990 у мышей, получавших плацебо, PM01183, гемцитабин и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 18

% T/C на день

Группа	Доза	Тест-материалы	0	3	6	8	10	13
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	100,0	74,3	61,3	59,4	56,7	56,1
G03	0,135 мг/кг	PM01183	99,6	81,3	71,0	73,1	65,6	63,1
G04	0,09 мг/кг	PM01183	101,1	81,5	72,8	68,7	68,4	74,4
G05	0,045 мг/кг	PM01183	100,2	83,6	82,8	93,3	82,9	88,1
G06	180,0 мг/кг	Гемцитабин	102,2	84,1	73,9	66,1	60,9	59,4
G07	135,0 мг/кг	Гемцитабин	102,3	78,3	71,9	63,7	55,4	52,7
G08	90,0 мг/кг	Гемцитабин	103,8	70,0	73,8	63,3	55,6	54,8
G09	45,0 мг/кг	Гемцитабин	102,3	85,5	70,3	70,5	63,3	64,8
G10	0,18 мг/кг 180,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	102,1	69,7	51,2	46,2	36,0	34,1
G11	0,135 мг/кг 135,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	100,4	64,6	52,8	51,5	48,9	46,0
G12	0,09 мг/кг 90,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	98,2	83,2	64,4	59,7	50,6	49,6
G13	0,045 мг/кг 45,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	97,7	81,6	70,9	68,8	65,9	65,7
Плацебо: как описано в примере 13								

Таблица 18 (продолжение)

% T/C на день

Группа	Доза	Тест-материалы	15	17	20	22	24	28
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	53,2	47,8	44,2	45,3	44,8	38,9
G03	0,135 мг/кг	PM01183	56,3	56,7	56,9	56,5	53,0	51,7
G04	0,09 мг/кг	PM01183	74,7	80,7	71,9	75,4	77,3	63,9
G05	0,045 мг/кг	PM01183	92,6	86,5	85,1	84,5	85,8	85,4
G06	180,0 мг/кг	Гемцитабин	58,5	52,1	49,1	48,6	46,9	39,3

G07	135,0 мг/кг	Гемцитабин	54,8	51,2	49,5	48,7	49,8	49,5
G08	90,0 мг/кг	Гемцитабин	49,9	47,4	47,6	47,0	45,9	49,2
G09	45,0 мг/кг	Гемцитабин	63,1	58,5	58,7	57,3	65,2	59,3
G10	0,18 мг/кг 180,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	34,7	31,6	31,7	28,0	26,0	22,7
G11	0,135 мг/кг 135,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	42,4	38,2	36,6	34,6	31,5	25,8
G12	0,09 мг/кг 90,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	47,4	46,0	43,8	49,1	46,0	42,9
G13	0,045 мг/кг 45,0 мг/кг	PM01183 Гемцитабин	57,9	59,9	55,9	54,9	52,1	50,5
Плацебо: как описано в примере 13								

10 В результате описанных исследований было установлено, что:
 а. Комбинированное лечение PM01183 и гемцитабином было эффективным в
 отношении ингибирования роста клеток опухоли поджелудочной железы SW 1990, что
 выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с
 15 контрольной группой, с величинами Т/С 22,7% и 25,8% (день 28) в двух группах,
 получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и гемцитабина давала
 более низкие значения Т/С, чем более активный единственный агент в данном
 эксперименте (PM01183 в дозе 0,18 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации
 20 (180 мг/кг гемцитабина + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с PM01183 в отдельности
 (0,18 мг/кг PM01183) составляли 31,7 против 44,2 (день 20), 28,0 против 45,3 (день 22),
 26,0 против 44,8 (день 24) и 22,7 против 38,9 (день 28). Таким образом, в случае, когда
 PM01183 комбинируют с гемцитабином, ясно наблюдается потенцирование
 противоопухолевой активности.

25 Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация PM01183 и
 гемцитабина давала величины СІ менее 1 (при Fa выше 0,8), что указывает на синергизм
 у мышей с ксенотрансплантатами опухоли поджелудочной железы SW1990.

ПРИМЕР 16. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации
 с темозоломидом на человеческие ксенотрансплантаты опухоли головного мозга

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать
 30 противоопухолевую активность темозоломида с использованием ксенотрансплантата
 человеческой опухоли головного мозга.

Для всех экспериментов использовали самок беспимусных мышей (Harlan Laboratories
 Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых
 клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-
 35 23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному
 корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение
 по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием супензии
 опухолевых клеток.

40 Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию
 U87-MG, которая была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC:
 НТВ-14TM).

Клетки U87-MG выращивали при 37°C с 5% CO₂ на минимальной эссенциальной
 среде Игла (MEME). Каждому животному на правом боку подкожно имплантировали
 45 5x10⁶ клеток U87-MG с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G, из *in vitro* пассажа
 5, в 0,05 мл супензии 50% Matrigel и 50% не содержащей сыворотки среды без
 антибиотиков.

Измерения размеров опухоли и переносимость лечения осуществляли и определяли,
 как описано в примере 13.

Когда опухоли достигали объема приблизительно 139 мм^3 , мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля ($N = 5-7$ на группу) на основании массы тела и измерений объема опухоли с использованием компьютерной программы NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

PM01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком PM01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 мг/мл. Маточный раствор PM01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Темозоломид поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением продукта в DMSO 10% в физиологическом растворе для инъекций до требующейся конечной концентрации.

В указанных экспериментах лечение PM01183 и темозоломидом, а также плацебо осуществляли следующим образом: PM01183, внутривенно один раз в неделю до 3 недель подряд, на день 0, 7 и 14; темозоломид перорально, на ежедневной основе в течение 8 дней подряд (дни с 0 по 7), а плацебо вводили по той же схеме, как PM01183 и темозоломид. Группам одного уровня дозы вводили или один агент, или комбинацию.

Сравнение медианы объема опухоли в группах, получавших лечение (T), с медианой объема опухоли в контрольной группе (T/C x 100%) использовали для оценки противоопухолевой эффективности. Помимо этого, потенцирование и индекс комбинирования (CI) определяли, как описано в примере 13.

Таблица 19 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и темозоломида, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 269 показывает эволюцию объема опухолей U87-MG у мышей, получавших плацебо, PM01183, темозоломид и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 19

Группа	Доза	Тест-материалы	% T/C на день							
			0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	99,8	95,5	64,8	63,2	52,0	44,1	38,5	37,1
G03	0,135 мг/кг	PM01183	98,5	90,5	61,2	71,3	67,7	65,3	64,2	63,6
G04	0,09 мг/кг	PM01183	97,9	99,5	74,4	85,1	69,4	71,8	74,1	73,5
G05	0,045 мг/кг	PM01183	98,2	101,0	80,4	83,8	78,8	77,7	76,7	82,5
G06	3,0 мг/кг	Темозоломид	97,1	95,5	67,3	39,4	25,3	22,9	28,4	31,5
G07	1,5 мг/кг	Темозоломид	94,1	96,9	75,6	73,0	56,5	59,3	50,0	53,5
G08	1,0 мг/кг	Темозоломид	98,2	100,2	65,1	81,2	55,0	63,5	73,1	75,0
G09	0,75 мг/кг	Темозоломид	97,7	98,9	76,3	77,3	64,4	63,1	62,8	72,7
G10	0,18 мг/кг 3,0 мг/кг	PM01183 Темозоломид	97,8	95,0	50,9	33,1	21,0	18,3	16,6	17,4
G11	0,135 мг/кг 1,5 мг/кг	PM01183 Темозоломид	98,7	102,4	62,7	42,0	30,3	29,1	29,0	30,9
G12	0,09 мг/кг 1,0 мг/кг	PM01183 Темозоломид	96,2	101,0	79,3	76,1	49,8	51,2	57,6	56,5
G13	0,045 мг/кг 0,75 мг/кг	PM01183 Темозоломид	101	106,0	67,4	73,0	57,8	59,0	69,3	72,2

Плацебо: как описано в примере 13

В результате описанных исследований было установлено, что:

а. Комбинированное лечение PM01183 и темозоломидом было эффективным в отношении ингибирования роста клеток опухоли головного мозга U87-MG, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами T/C 17,4% и 30,9% (день 16) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и темозоломида давала

более низкие значения Т/С, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (темозоломид в дозах 3 мг/кг и 1,5 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (3 мг/кг темозоломида + 0,18 мг/кг РМ01183) по сравнению с темозоломидом в отдельности (3 мг/кг темозоломида) составляли 18,3 против 22,9 (день 11), 16,6 против 28,4 (день 14) и 17,4 против 31,5 (день 16), а значения ТС (%) комбинации (1,5 мг/кг темозоломида + 0,135 мг/кг РМ01183) по сравнению с темозоломидом в отдельности (1,5 мг/кг темозоломида) составляли 29,1 против 59,3 (день 11), 29,0 против 50,0 (день 14) и 30,9 против 53,5 (день 16). Таким образом, в случае, когда РМ01183 комбинируют с темозоломидом, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация РМ01183 и темозоломида давала величины СІ менее 1 (при Fa выше 0,8), что указывает на синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли головного мозга U87-MG.

ПРИМЕР 17. Исследования *in vitro* для определения влияния РМ01183 в комбинации с иринотеканом на человеческие ксенотрансплантаты опухоли легкого

Целью данного исследования было определение способности РМ01183 потенцировать противоопухолевую активность иринотекана с использованием ксенотрансплантата человеческого рака легкого.

Для всех экспериментов использовали самок бестимусных мышей (Harlan Laboratories Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием суспензии опухолевых клеток.

Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию Н460, которая была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC ref. HTB-177TM).

Клетки Н460 выращивали при 37°C с 5% CO₂ на среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM). Каждому животному на правом боку подкожно имплантировали 5x10⁶ клеток Н460 с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G, из *in vitro* пассажа 10, в 0,05 мл суспензии 50% Matrigel и 50% не содержащей сыворотки среды без антибиотиков.

Измерения размеров опухоли и переносимость лечения осуществляли и определяли, как описано в примере 13.

Когда опухоли достигали объема приблизительно 177 mm³, мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля (N = 5-7 на группу) на основании массы тела и измерений объема опухоли с использованием компьютерной программы NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

РМ01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком РМ01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 мг/мл. Маточный раствор РМ01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Иринотекан поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением продукта физиологическом раствором для инъекций до концентрации маточного раствора 40 мг/мл. Маточный раствор гемцитабина далее разводили 5% раствором глюкозы для инъекций до требующейся конечной концентрации.

В указанных экспериментах лечение РМ01183 и иринотеканом, а также плацебо осуществляли путем внутривенного введения следующим образом: РМ01183 один раз

в неделю до 2 недель подряд на день 0 и 7; иринотекан вводили раз в 4 дня, на день 0, 4 и 8, и плацебо вводили по той же схеме, что PM01183 и иринотекан. Группам одного уровня дозы вводили или один агент, или комбинацию.

Сравнение медианы объема опухоли в группах, получавших лечение (T), с медианой объема опухоли в контрольной группе (T/C x 100%) использовали для оценки противоопухолевой эффективности. Помимо этого, потенцирование и индекс комбинирования (CI) определяли, как описано в примере 13.

Таблица 20 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и иринотекана, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 270 показывает эволюцию объема опухолей H460 у мышей, получавших плацебо, PM01183, иринотекан и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 20

Группа	Доза	Тест-материалы	% Т/С на день					
			0	2	5	7	9	12
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	114,4	79,6	74,7	75,0	69,1	64,9
G03	0,135 мг/кг	PM01183	117,6	77,4	67,5	71,7	66,7	52,9
G04	0,09 мг/кг	PM01183	116,9	83,1	83,9	76,9	80,6	84,9
G05	0,045 мг/кг	PM01183	108,3	78,7	61,2	67,2	78,8	87,9
G06	50,0 мг/кг	Иринотекан	112,1	54,9	34,7	27,5	24,8	22,9
G07	37,5 мг/кг	Иринотекан	114,9	51,9	44,0	36,7	35,6	37,0
G08	25,0 мг/кг	Иринотекан	112,0	55,6	54,9	49,6	53,1	51,8
G09	12,5 мг/кг	Иринотекан	97,5	50,3	44,4	48,6	50,0	51,5
G10	0,18 мг/кг 50,0 мг/кг	PM01183 Иринотекан	117,1	44,3	19,4	13,4	10,9	9,0
G11	0,135 мг/кг 37,5 мг/кг	PM01183 Иринотекан	111,2	51,7	23,8	18,4	15,7	15,3
G12	0,09 мг/кг 25,0 мг/кг	PM01183 Иринотекан	110,0	53,2	38,1	26,6	28,0	27,1
G13	0,045 мг/кг 12,5 мг/кг	PM01183 Иринотекан	109,0	60,4	60,1	56,5	60,0	58,5
Плацебо: как описано в примере 13								

В результате описанных исследований было установлено, что:

а. Комбинированное лечение PM01183 и иринотеканом было эффективным в отношении ингибирования роста клеток опухоли легкого H460, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами T/C 9,0% и 15,3% (день 12) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и иринотекана давала более низкие значения T/C, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (иринотекан в дозах 50 мг/кг и 37,5 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (50 мг/кг иринотекана + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с иринотеканом в отдельности (50 мг/кг иринотекана) составляли 19,4 против 34,7 (день 5), 13,4 против 27,5 (день 7), 10,9 против 24,8 (день 9) и 9,0 против 22,9 (день 12), а значения ТС (%) комбинации (37,5 мг/кг иринотекана + 0,135 мг/кг PM01183) по сравнению с иринотеканом в отдельности (37,5 мг/кг иринотекана) составляли 23,8 против 44,0 (день 5), 18,4 против 36,7 (день 7), 15,7 против 35,6 (день 9) и 15,3 против 37,0 (день 12). Таким образом, в случае, когда PM01183 комбинируют с иринотеканом, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация PM01183 и иринотекана давала величины CI менее 1 (при Fa выше 0,8), что указывает на синергизм

или сильный синергизм у мышей с ксенотрансплантатами опухоли легкого Н460.

ПРИМЕР 18. Исследования *in vitro* для определения влияния РМ01183 в комбинации с дакарбазином на человеческие ксенотрансплантаты фибросаркомы

Целью данного исследования было определение способности РМ01183 потенцировать

противоопухолевую активность дакарбазина с использованием ксенотрансплантата человеческой фибросаркомы.

Для всех экспериментов использовали самок бестимусных мышей (Harlan Laboratories Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-
23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием суспензии опухолевых клеток.

Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию НТ1080, которая была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC ref. CCL-121TM).

Клетки НТ1080 выращивали при 37°C с 5% CO₂ на минимальной эссенциальной среде Игла (MEME). Каждому животному ортоптически имплантировали в икроножную мышцу путем внутримышечной инъекции с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G 5x10⁶ клеток НТ1080, из *in vitro* пассажа 9, суспендированные в не содержащей сыворотки среде без антибиотиков.

Общий диаметр (опухоль+конечность) измеряли с использованием штангенциркуля с цифровой индикацией (Fowler Sylvac, S235PAT). Указанные общий диаметр и массу тела животных измеряли 2-3 раза в неделю, начиная с первого дня лечения.

Переносимость лечения оценивали путем мониторинга эволюции массы тела, клинических признаков, а также свидетельств локального повреждения в месте инъекции.

Когда общий диаметр достигал приблизительно 11,3 мм, мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля (N = 5-7 на группу) на основании массы тела и измерений опухоли с использованием компьютерной программы NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

РМ01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком РМ01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 мг/мл. Маточный раствор РМ01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Дакарбазин поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением продукта 5% раствором глюкозы для инъекций до требующейся конечной концентрации.

В указанных экспериментах лечение РМ01183 и дакарбазином, а также плацебо осуществляли путем внутривенного введения один раз в неделю до 2 недель подряд на день 0 и 7. Группам одного уровня дозы вводили или один агент, или комбинацию.

Сравнение медианы общего диаметра (опухоль + конечность) в группах, получавших лечение (T), с медианой общего диаметра (опухоль+конечность) в контрольной группе (T/Cx100%) использовали для оценки противоопухолевой эффективности. Помимо этого, потенцирование и индекс комбинирования (CI) определяли, как описано в примере 13.

Таблица 21 представляет величины % T/C, полученные в исследовании РМ01183 и дакарбазина, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 271 показывает эволюцию общего диаметра (опухоль

+ конечность) опухолей HT1080 у мышей, получавших плацебо, PM01183, дакарбазин и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 21

Группа	Доза	Тест-материалы	% ТС на день							
			0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 мг/кг	PM01183	100	59,3	40,0	26,9	26,7	11,5	21,2	30,6
G03	0,135 мг/кг	PM01183	100	63,0	62,9	48,1	36,0	30,2	33,0	41,9
G04	0,09 мг/кг	PM01183	100	66,7	57,1	65,4	48,0	42,7	45,8	56,4
G05	0,045 мг/кг	PM01183	100	77,8	74,3	94,2	80,0	74,0	80,5	91,1
G06	150 мг/кг	Дакарбазин	100	40,7	28,6	30,8	44,0	37,5	44,9	57,3
G07	112,5 мг/кг	Дакарбазин	100	48,1	34,3	53,8	48,0	37,5	43,2	53,2
G08	75,0 мг/кг	Дакарбазин	100	74,1	65,7	69,2	58,7	45,8	46,6	51,6
G09	37,5 мг/кг	Дакарбазин	100	51,8	54,3	65,4	61,3	47,9	55,1	62,1
G10	0,18 мг/кг 150,0 мг/кг	PM01183 Дакарбазин	100	37,0	22,9	17,3	4,0	10,4	-4,2	1,0
G11	0,135 мг/кг 112,5 мг/кг	PM01183 Дакарбазин	100	29,6	25,7	11,5	-8,0	-17,7	-6,8	7,3
G12	0,09 мг/кг 75,0 мг/кг	PM01183 Дакарбазин	100	37,0	31,4	28,8	52,0	43,7	50,8	64,5
G13	0,045 мг/кг 37,5 мг/кг	PM01183 Дакарбазин	100	55,6	51,4	67,3	70,7	62,5	59,3	62,1

Плацебо: как описано в примере 13

В результате описанных исследований было установлено, что:

а. Комбинированное лечение PM01183 и дакарбазином было эффективным в отношении ингибирования роста клеток фибросаркомы HT1080, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении общего диаметра (опухоль+конечность) по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/С 1,0% и 7,3% (день 16) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и дакарбазина давала более низкие значения Т/С, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (PM01183 в дозах 0,18 мг/кг и 0,135 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (150 мг/кг дакарбазина + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с PM01183 в отдельности (0,18 мг/кг PM01183) составляли 4,0 против 26,7 (день 9), 10,4 против 11,5 (день 11), -4,2 против 21,2 (день 14) и 1,0 против 30,6 (день 16), а значения ТС (%) комбинации (112,5 мг/кг дакарбазина + 0,135 мг/кг PM01183) по сравнению с PM01183 в отдельности (0,135 мг/кг PM01183) составляли -8,0 против 36,0 (день 9), -17,7 против 30,2 (день 11), -6,8 против 33,0 (день 14) и 7,3 против 41,9 (день 16). Таким образом, в случае, когда PM01183 комбинируют с дакарбазином, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

Помимо этого, на основе принципа медиана-эффект, комбинация PM01183 и дакарбазина давала величины СІ 0,28 (при Fa равном 0,97), что указывает на сильный синергизм у мышей с ортоптически имплантированными опухолями фибросаркомы HT1080.

ПРИМЕР 19. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с иринотеканом на человеческие ксенотрансплантаты колоректальной опухоли

Целью данного исследования было определение способности PM01183 потенцировать противоопухолевую активность иринотекана с использованием ксенотрансплантата человеческой колоректальной карциномы.

Для всех экспериментов использовали самок бестимусных мышей (Harlan Laboratories Models, S.L. (Барселона, Испания). Животных содержали в отдельно вентилируемых клетках, до десяти животных в клетке, с 12-часовым циклом света-темноты, при 21-

23°C и 40-60% влажности. Мыши имели свободный доступ к облученному стандартному корму для грызунов и стерилизованной воде. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней до имплантации опухоли с использованием супензии опухолевых клеток.

⁵ Модель опухоли в указанных исследованиях представляла собой клеточную линию HT-29, которая была получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC ref. HTB-38TM).

¹⁰ Клетки HT-29 выращивали при 37°C с 5% CO₂ на среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM). Каждому животному на правом боку подкожно имплантировали 5x10⁶ клеток HT-29 с помощью 1-кубового шприца с иглой 26G, из *in vitro* пассажа 10, в 0,05 мл физиологического раствора для инъекций.

¹⁵ Измерения размеров опухоли и переносимость лечения осуществляли и определяли, как описано в примере 13. Переносимость лечения оценивали путем мониторинга эволюции массы тела, клинических признаков, а также свидетельств локального повреждения в месте инъекции.

²⁰ Когда опухоли достигали объема приблизительно 180 mm³, мышей случайным образом распределяли на группы лечения и контроля (N = 5-7 на группу) на основании массы тела и измерений объема опухоли с использованием компьютерной программы NewLab Oncology (версия 2.25.06.00).

²⁵ PM01183 поставлялся в форме флаконов с лиофилизованным сухим осадком PM01183, который повторно растворяли в воде для инфузий до концентрации 0,2 mg/ml. Маточный раствор PM01183 далее разводили в 5% растворе глюкозы для инъекций до требующихся концентраций. Иринотекан поставлялся в форме раствора, изготовленного разбавлением продукта 5% раствором глюкозы для инъекций до требующейся конечной концентрации.

³⁰ В указанных экспериментах лечение PM01183 и иринотеканом, а также плацебо осуществляли путем внутривенного введения следующим образом: PM01183 один раз в неделю до 3 недель подряд на день 0, 7 и 14; иринотекан вводили раз в 4 дня, на день 0, 4, 8, 12 и 16, и плацебо вводили по той же схеме, что PM01183 и иринотекан. Группам одного уровня дозы вводили или один агент, или комбинацию.

³⁵ Сравнение медианы объема опухоли в группах, получавших лечение (T), с медианой объема опухоли в контрольной группе (T/C x 100%) использовали для оценки противоопухолевой эффективности. Помимо этого, потенцирование определяли, как описано в примере 13.

⁴⁰ Таблица 22 представляет величины % T/C, полученные в исследовании PM01183 и иринотекана, введенных как в виде единственных агентов, так и в комбинации для каждого уровня дозы, а фигура 272 показывает эволюцию объема опухолей HT-29 у мышей, получавших плацебо, PM01183, иринотекан и соответствующие комбинации для групп, получавших два высших соотношения доз.

Таблица 22						
Группа	Доза	Тест-материалы	% T/C на день			
			0	3	5	7
G01 (Контрольная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	100,4	108,4	86,5	101,1
G03	0,135 mg/kg	PM01183	98,4	106,4	95,3	116,6
G04	0,09 mg/kg	PM01183	98,4	100,9	88,7	121,9
G05	0,045 mg/kg	PM01183	99,8	103,7	100,6	111,1
						135,8

	G06	50,0 мг/кг	Иринотекан	100,1	114,7	93,7	96,1	70,5
	G07	37,5 мг/кг	Иринотекан	98,4	108,1	97,5	99,2	84,3
	G08	25,0 мг/кг	Иринотекан	98,8	108,6	97,2	101,4	96,5
	G09	12,5 мг/кг	Иринотекан	99,0	99,1	90,6	97,4	92,7
5	G10	0,18 мг/кг 50,0 мг/кг	PM01183 Иринотекан	99,5	101,8	78,3	77,5	51,6
	G11	0,135 мг/кг 37,5 мг/кг	PM01183 Иринотекан	98,4	98,0	85,2	85,4	60,7
	G12	0,09 мг/кг 25,0 мг/кг	PM01183 Иринотекан	99,7	96,4	71,7	77,0	62,7
	G13	0,045 мг/кг 12,5 мг/кг	PM01183 Иринотекан	100,7	104,8	104,3	116,0	98,8
10	Плацебо: как описано в примере 13							

Таблица 22 (продолжение)

Группа	Доза	Тест-материалы	% T/C на день					
			12	14	17	20		
15	G01 (Контроль-ная группа)	10 мл/кг	Плацебо	-	-	-	-	
	G02	0,18 мг/кг	PM01183	115,4	123,4	86,7	77,5	
	G03	0,135 мг/кг	PM01183	119,1	121,5	133,1	105,2	
	G04	0,09 мг/кг	PM01183	114,1	109,4	116,1	93,4	
20	G05	0,045 мг/кг	PM01183	125,1	109,3			
	G06	50,0 мг/кг	Иринотекан	61,7	51,7	41,4	33,3	
	G07	37,5 мг/кг	Иринотекан	77,4	65,0	58,4	49,4	
	G08	25,0 мг/кг	Иринотекан	79,3	82,5	76,3	60,3	
	G09	12,5 мг/кг	Иринотекан	90,8	89,4	102,6	93,4	
25	G10	0,18 мг/кг 50,0 мг/кг	PM01183 Иринотекан	43,8	30,4	21,7	15,6	
	G11	0,135 мг/кг 37,5 мг/кг	PM01183 Иринотекан	51,9	40,1	39,2	28,7	
	G12	0,09 мг/кг 25,0 мг/кг	PM01183 Иринотекан	57,7	50,1	47,2	40,7	
	G13	0,045 мг/кг 12,5 мг/кг	PM01183 Иринотекан	85,5	90,5	88,1	76,5	
30	Плацебо: как описано в примере 13							

В результате описанных исследований было установлено, что:

а. Комбинированное лечение PM01183 и иринотеканом было эффективным в отношении ингибирования роста клеток человеческой колоректальной карциномы НТ-29, что выражалось в статистически значимом ($P<0,01$) уменьшении опухоли по сравнению с контрольной группой, с величинами Т/C 15,6% и 28,7% (день 20) в двух группах, получавших высокие дозы. Помимо этого, комбинация PM01183 и иринотекана давала более низкие значения Т/C, чем более активный единственный агент в данном эксперименте (иринотекан в дозах 50 мг/кг и 37,5 мг/кг). Конкретно, значения ТС (%) комбинации (50 мг/кг иринотекана + 0,18 мг/кг PM01183) по сравнению с иринотеканом в отдельности (50 мг/кг иринотекана) составляли 30,4 против 51,7 (день 14), 21,7 против 41,4 (день 17) и 15,6 против 33,3 (день 20), а значения ТС (%) комбинации (37,5 мг/кг иринотекана + 0,135 мг/кг PM01183) по сравнению с иринотеканом в отдельности (37,5 мг/кг иринотекана) составляли 40,1 против 65,0 (день 14), 39,2 против 58,4 (день 17) и 28,7 против 49,4 (день 20). Таким образом, в случае, когда PM01183 комбинируют с иринотеканом, ясно наблюдается потенцирование противоопухолевой активности.

ПРИМЕР 20. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации с химиотерапевтическими агентами на человеческие лейкозные клеточные линии

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: метотрексат, даунорубицин, аплидин, ET-743, PM02734 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные серийные

разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до достижения конечной 4Х концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования были выбраны человеческие лейкозные клеточные линии JURCAT и MOLT-4, которые были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки JURCAT и MOLT-4 выращивали на не содержащей фенолового красного среде RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа:

а. В первой серии исследований величины относительную активность каждого соединения против различных клеточных линий с помощью цитотоксического исследования *in vitro* определяли для каждого лекарственного средства на клетках A549 после 72 часов воздействия.

Кратко, клетки засевали на 96-луночные микротитрационные планшеты с плотностью 50000 клеток в 150 мкл культуральной среды и инкубировали в течение 4-6 часов в среде, не содержащей лекарственного средства, до обработки только носителем или испытуемыми соединениями в течение 72 часов.

После инкубации цитотоксический эффект измеряли анализом восстановления МТТ.

50 мкл раствора МТТ (1 мг/мл) добавляли в лунки и инкубировали в течение 15-17 часов при 37°C до образования кристаллов формазана. После осторожного удаления культуральной среды добавляли DMSO для растворения нерастворимого пурпурного формазана с получением окрашенного раствора. Спектральную поглощательную способность лунок оценивали количественно измерением оптической плотности на 540 нм. Результаты выражали в процентных долях от контрольного клеточного роста.

Величины EC₅₀(половина максимальной эффективной концентрации), использовавшиеся для исследований комбинаций, рассчитывали с использованием компьютерной программы Prism v5.02 (GraphPad). Результаты выражали как молярную концентрацию и представляли среднюю величину по меньшей мере от трех независимых анализов.

Индивидуальные величины EC₅₀, полученные для каждого лекарственного средства, представлены в таблицах 23 и 24.

Таблица 23
Величины EC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента на опухолевой клеточной линии JURCAT

Соединение	EC ₅₀ (M)	Соединение	EC ₅₀ (M)	Соединение	EC ₅₀ (M)
Метотрексат	1,45E-07	Даунорубицин	7,92E-07	Аплидин	1,38E-08
ET-743	6,96E-09	PM00104	4,83E-09	PM01183	1,55E-09
PM02734	5,50E-06				

Таблица 24
Величины EC₅₀ в молярной концентрации (M) для каждого агента на опухолевой клеточной линии MOLT-4

Соединение	EC ₅₀ (M)	Соединение	EC ₅₀ (M)	Соединение	EC ₅₀ (M)
Метотрексат	4,39E-08	Аплидин	1,27E-09	ET-743	3,84E-09
PM00104	1,55E-09	PM01183	8,57E-10	PM02734	1,44E-05

45 б. Во второй серии исследований получали кривые доза-ответ для агентов по отдельности или в комбинации двух лекарственных средств с использованием методики, описанной в предыдущем абзаце.

При установленных значимых различиях между соответствующими величинами EC₅₀ для PM01183 и других стандартных лекарственных средств в данном исследовании

использовались различные соотношения фиксированных концентраций для двух лекарственных средств. Обычно выбор фиксированных соотношений концентраций падал на эквипotentное соотношение (1:1) при величине EC₅₀ для каждого лекарственного средства, а также некоторые другие соотношения, представляющие 5 различные процентные доли соответствующих величин EC₅₀ для каждого лекарственного средства, выше или ниже него. Используя указанные исходные концентрации, осуществляли непрерывные серийные разведения для получения кривых доза-ответ для каждой серии лекарственных средств, по отдельности или в комбинации.

10 Эффект двухлекарственной комбинации по сравнению с эффектом каждого лекарственного средства по отдельности оценивали с использованием способа Чоу и Талала, который основан на принципе медиана-эффект (Chou and Talalay, Adv. Enzyme Regul. 1984, 22, 27-55). Уравнение медиана-эффект: $f_a/f_u = (C/C_m)^m$ (где C представляет собой концентрацию лекарственного средства, C_m представляет собой концентрацию 15 медиана-эффект (т.е. IC₅₀, ED₅₀ или LD₅₀, которая ингибирует систему в исследовании на 50%), f_a представляет собой клеточную фракцию, на которую оказала воздействие концентрация лекарственного средства C, f_u представляет собой фракцию, на которую не оказала воздействие концентрация лекарственного средства, а m представляет собой 20 коэффициент сигмовидности кривой концентрация-ответ) описывает взаимоотношения между концентрацией и эффектом лекарственного средства в данной биологической системе.

На основе указанного уравнения термин «индекс комбинирования» (CI) используется как количественная мера степени лекарственных взаимодействий. Индекс комбинирования (CI) определяется уравнением:

$$CI = (C_x)_1 / (C_x)_1 + (C_x)_2,$$

где (C_x)₁ представляет собой концентрацию лекарственного средства 1 в отдельности, которая ингибирует процентную долю системы x, (C_x)₂ представляет собой 30 концентрацию лекарственного средства 2 в отдельности, которая ингибирует процентную долю системы x, а (C)₁+(C)₂ представляют собой концентрации лекарственного средства 1 и лекарственного средства 2, которые в комбинации также ингибируют процентную долю системы x. Величины CI рассчитывали путем решения уравнения для различных величин f_a (т.е. для различных степеней ингибирования 35 клеточного роста). Величины CI<1 указывают на синергизм, величина 1 указывает на аддитивные эффекты, а величины >1 указывают на антагонизм.

Данные анализировали с помощью компьютерной программы CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK). Для статистического анализа и графиков использовали компьютерную программу Prism (GraphPad, San Diego, USA). Все результаты представляют собой 40 среднюю величину по меньшей мере из трех независимых экспериментов.

Влияние испытуемых комбинаций лекарственных средств на пролиферацию клеток показано на фигурах 273-283:

- Комбинация PM01183 с метотрексатом. Комбинация PM01183 с метотрексатом на клеточной линии JURCAT (фигура 273) оказывала некоторое синергическое действие 45 (CI<1) при определенных концентрациях обоих лекарственных средств. Эффекты PM01183 в комбинации с метотрексатом на клетках MOLT-4 (фигура 274) были, главным образом, аддитивными.

- Комбинация PM01183 с даунорубицином. Комбинация PM01183 с даунорубицином

на клеточной линии JURCAT (фигура 275) была аддитивной или синергической ($CI<1$) при определенных концентрациях соединений.

- Комбинация PM01183 с аплидином. Комбинация PM01183 с аплидином на клеточной линии JURCAT (фигура 276) и MOLT-4 (фигура 277) оказывала некоторое синергическое действие ($CI<1$) при определенных концентрациях обоих лекарственных средств.

- Комбинация PM01183 с ET-743. Комбинация PM01183 с ET-743 на клеточной линии JURCAT (фигура 278) была аддитивной или синергической ($CI<1$) при определенных концентрациях обоих лекарственных средств. Комбинация PM01183 с ET-743 на клетках MOLT-4 (фигура 279) была, главным образом, аддитивной.

10 - Комбинация PM01183 с PM00104. Комбинация PM01183 с PM00104 на клеточной линии JURCAT (фигура 280) была по меньшей мере аддитивной, приводящей к некоторым синергическим эффектам ($CI<1$). Комбинация PM01183 с PM00104 на клетках MOLT-4 (фигура 281) оказывала синергическое действие ($CI<1$).

15 - Комбинация PM01183 с PM02734. Комбинация PM01183 с PM02734 на клеточной линии JURCAT (фигура 282) была, главным образом, аддитивной, приводящей к некоторым синергическим эффектам ($CI<1$) при определенных концентрациях обоих лекарственных средств. Комбинация PM01183 с PM02734 на клетках MOLT-4 (фигура 283) оказывала синергическое действие ($CI<1$).

ПРИМЕР 21. Исследования *in vitro* для определения влияния PM01183 в комбинации 20 с химиотерапевтическими агентами на человеческие клеточные линии лимфомы

Следующие агенты оценивали в комбинации с PM01183: гемцитабин, цитарabin, метотрексат, даунорубицин, ET-743, PM02734 и PM00104 (маточные растворы указанных соединений изготавливали в чистом DMSO и хранили при -20°C). Дополнительные 25 серийные разведения осуществляли не содержащей сыворотки культуральной средой до достижения конечной 4X концентрации. В лунки добавляли аликовты по 50 мкл каждого разведенного соединения.

Для данного исследования были выбраны человеческие клеточные линии лимфомы RAMOS и U-937, которые были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки RAMOS и U-937 выращивали на не содержащей фенолового красного 30 среде RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина, при 37°C , 5% CO_2 и 95% влажности.

Скрининг осуществляли в два этапа, как описано в примере 20:

а. В первой серии исследований определяли индивидуальные величины EC_{50} для 35 каждого лекарственного средства, как показано в таблицах 25 и 26.

Таблица 25
Величины EC_{50} в молярной концентрации (M) для каждого агента на опухолевой клеточной линии RAMOS

Соединение	EC_{50} (M)	Соединение	EC_{50} (M)	Соединение	EC_{50} (M)
Гемцитабин	2,51E-08	Цитарабин	3,64E-08	Метотрексат	5,02E-06
Даунорубицин	3,15E-07	ET-743	9,55E-09	PM00104	4,35E-09
PM01183	1,39E-09	PM02734	1,364E-05		

Таблица 26
Величины EC_{50} в молярной концентрации (M) для каждого агента на опухолевой клеточной линии U-937

Соединение	EC_{50} (M)	Соединение	EC_{50} (M)	Соединение	EC_{50} (M)
Гемцитабин	3,27E-08	Метотрексат	2,63E-08	Даунорубицин	3,04E-07
ET-743	8,62E-09	PM00104	4,50E-09	PM01183	1,03E-09
PM02734	6,85E-06				

45 б. Во второй серии исследований получали кривые доза-ответ для агентов по отдельности или в комбинации двух лекарственных средств. Эффекты комбинаций

лекарственных средств оценивали с использованием способа Чоу и Талалая, как описано в примере 20.

Влияние испытуемых комбинаций лекарственных средств на пролиферацию клеток показано на фигурах 284-296:

- 5 - Комбинация PM01183 с цитарабином. Комбинация PM01183 с цитарабином на клеточной линии RAMOS (фигура 284) оказывала некоторое синергическое действие (CI<1).
- Комбинация PM01183 с метотрексатом. Комбинация PM01183 с метотрексатом на клеточной линии RAMOS (фигура 285) оказывала некоторое синергическое действие
- 10 (CI<1) при определенных концентрациях обоих лекарственных средств. Комбинация PM01183 с метотрексатом на клеточной линии U-937 (фигура 286) оказывала некоторое синергическое действие при определенных концентрациях.
- Комбинация PM01183 с гемцитабином. Комбинация PM01183 с гемцитабином на клеточной линии RAMOS (фигура 287) была аддитивной или синергической (CI<1) при
- 15 определенных концентрациях обоих лекарственных средств. Комбинация PM01183 с гемцитабином на клеточной линии U-937 (фигура 288) оказывала синергическое действие (CI<1).
- Комбинация PM01183 с даунорубицином. Комбинация PM01183 с даунорубицином на клеточной линии RAMOS (фигура 289) и клеточной линии U-937 (фигура 290) была
- 20 по меньшей мере аддитивной, приводящей к некоторым синергическим эффектам (CI<1).
- Комбинация PM01183 с ET-743. Комбинация PM01183 с ET-743 на клеточной линии RAMOS (фигура 291) и клеточной линии U-937 (фигура 292) оказывала синергическое действие (CI<1) при определенных концентрациях соединений.
- Комбинация PM01183 с PM00104. Комбинация PM01183 с PM00104 на клеточной
- 25 линии RAMOS (фигура 293) оказывала синергическое действие (CI<1). Комбинация PM01183 с PM00104 на клетках U-937 (фигура 294) оказывала некоторое синергическое действие (CI<1) при определенных концентрациях обоих лекарственных средств.
- Комбинация PM01183 с PM02734. Комбинация PM01183 с PM02734 на клеточной линии RAMOS (фигура 295) оказывала синергическое действие (CI<1), в то время как
- 30 комбинация PM01183 с PM02734 на клетках U-937 (фигура 296) была по меньшей мере аддитивной, приводящей к некоторым синергическим эффектам (CI<1) при высоких концентрациях обоих лекарственных средств.

Формула изобретения

- 35 1. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, который нуждается в указанном лечении, терапевтически эффективного количества PM01183 или его фармацевтически приемлемой соли в синергической комбинации с терапевтически эффективным количеством антиметаболита, в котором антиметаболит выбран из 5-фторурацила, гемцитабина, цитараамина, капецитабина, децитабина, флоксуридина, аминоптерина, метотрексата, пеметрекседа и ралтитрекседа.
- 40 2. Способ по п. 1, в котором рак, подлежащий лечению, выбран из рака легкого, саркомы, злокачественной меланомы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака желудка, рака яичника, гепатомы, рака молочной железы, колоректального рака, рака почки, рака пищевода, нейробластомы, рака головного мозга, рака шейки матки, анального рака, рака яичка, лейкоза, множественной миеломы и лимфомы.
- 45 3. Способ по п. 2, в котором PM01183 или его фармацевтически приемлемая соль и антиметаболит образуют часть одного и того же лекарственного препарата.

4. Способ по п. 2, в котором РМ01183 или его фармацевтически приемлемая соль и антиметаболит поставляются в форме отдельных лекарственных препаратов для введения в одно и то же время или в разное время.

5. Способ по п. 4, в котором РМ01183 или его фармацевтически приемлемая соль и антиметаболит поставляются в форме отдельных лекарственных препаратов для введения в разное время.

6. Способ по п. 1, в котором антиметаболит выбран из 5-фторурацила, капецитабина, гемцитабина, цитарарабина и метотрексата.

7. Применение РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в синергической комбинации с антиметаболитом, в котором антиметаболит выбран из 5-фторурацила, гемцитабина, цитарарабина, капецитабина, децитабина, флоксуродина, аминоптерина, метотрексата, пеметрекседа и ралтитрекседа, в лечении рака.

8. Применение РМ01183 или его фармацевтически приемлемой соли в синергической комбинации с антиметаболитом, в котором антиметаболит выбран из 5-фторурацила, гемцитабина, цитарарабина, капецитабина, децитабина, флоксуродина, аминоптерина, метотрексата, пеметрекседа и ралтитрекседа, в производстве лекарственного средства для лечения рака.

20

25

30

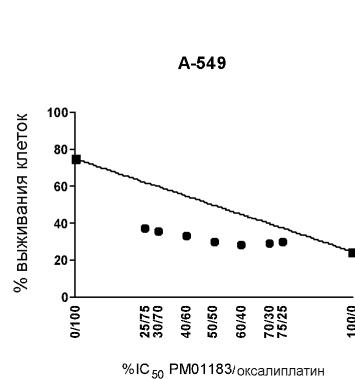
35

40

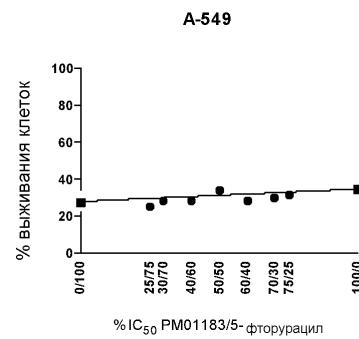
45

195199

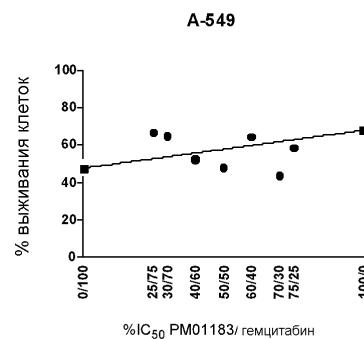
1/62



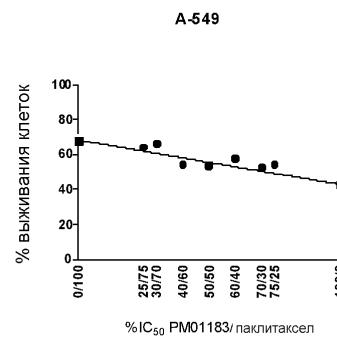
ФИГ. 1



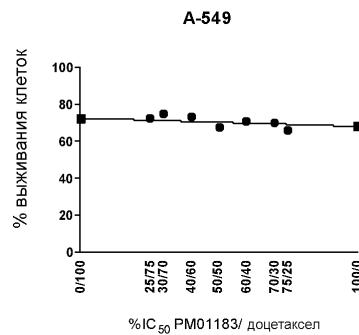
ФИГ. 2



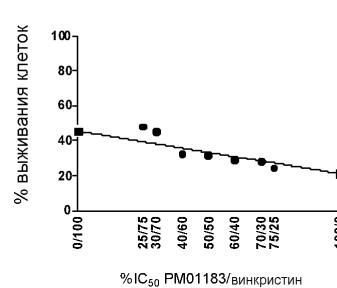
ФИГ. 3



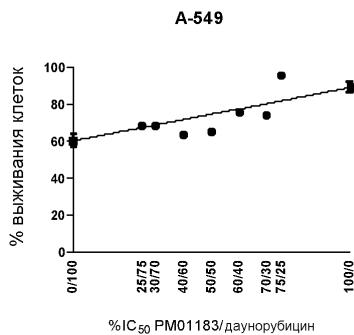
ФИГ. 4



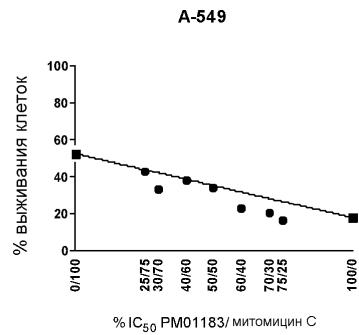
ФИГ. 5



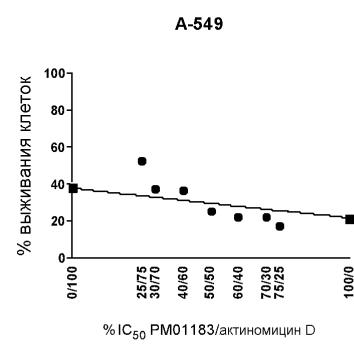
ФИГ. 6



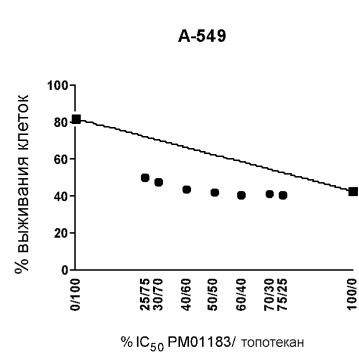
ФИГ. 7



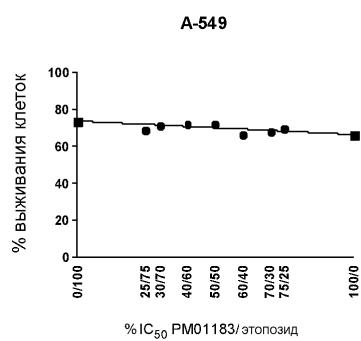
ФИГ. 8



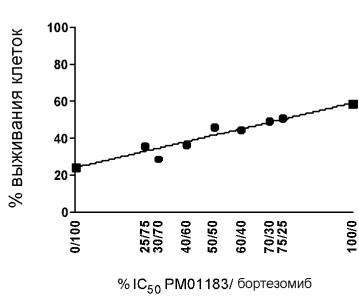
ФИГ. 9



ФИГ. 10

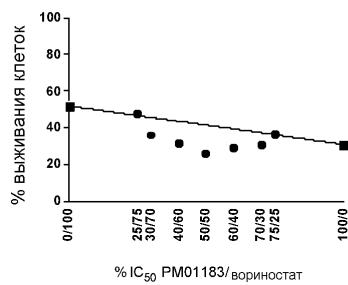


ФИГ. 11



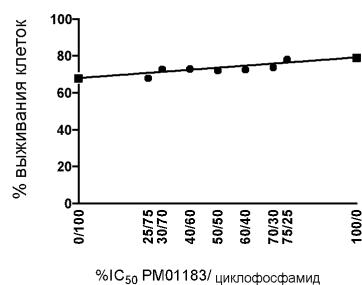
ФИГ. 12

A-549



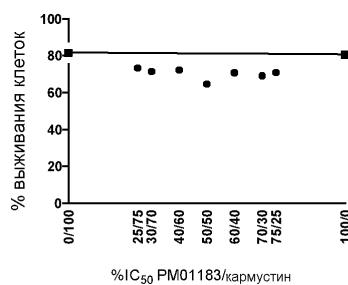
ФИГ. 13

A-549



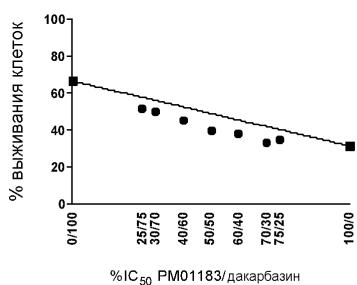
ФИГ. 14

A-549



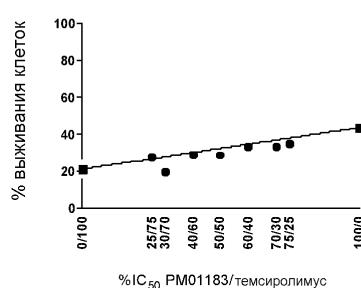
ФИГ. 15

A-549



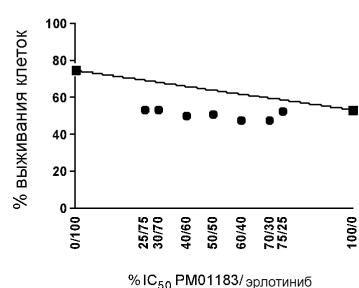
ФИГ. 16

A-549

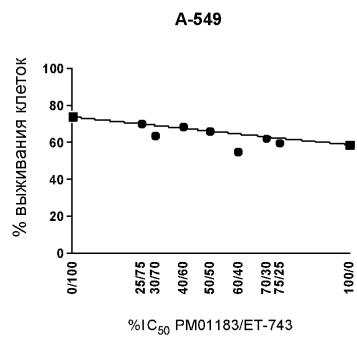


ФИГ. 17

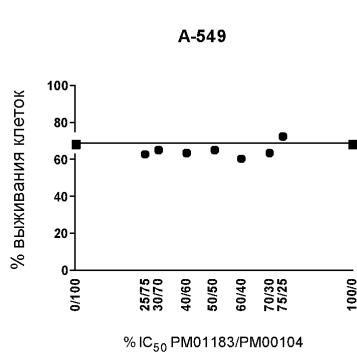
A-549



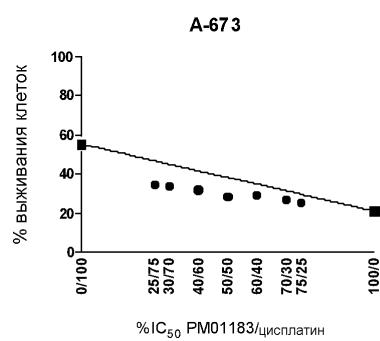
ФИГ. 18



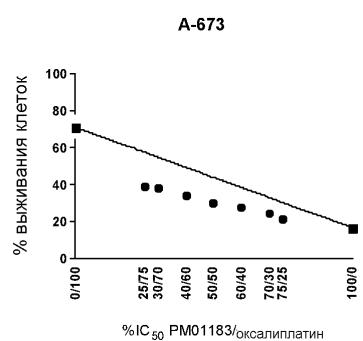
ФИГ. 19



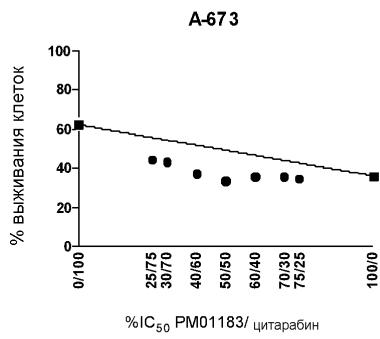
ФИГ. 20



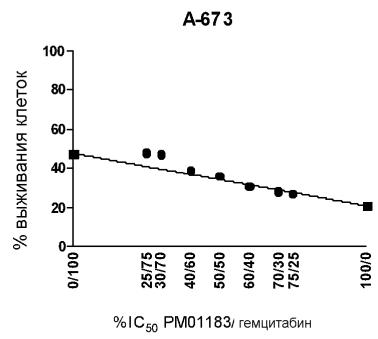
ФИГ. 21



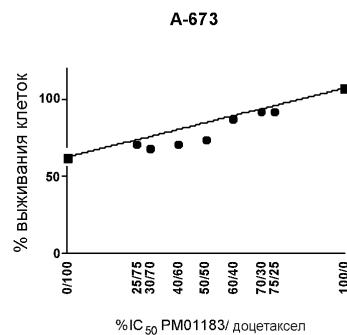
ФИГ. 22



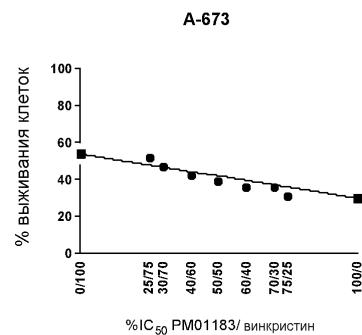
ФИГ. 23



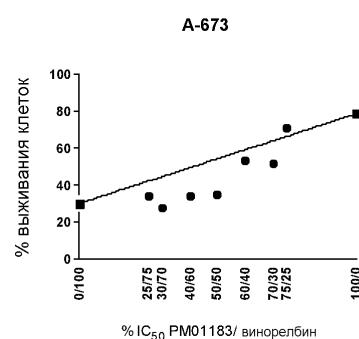
ФИГ. 24



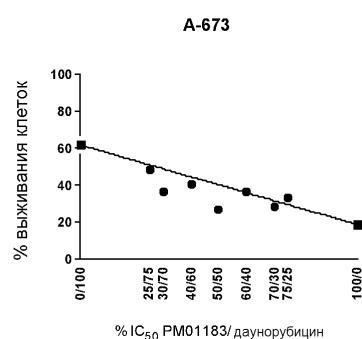
ФИГ. 25



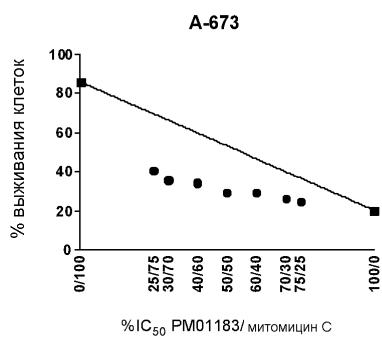
ФИГ. 26



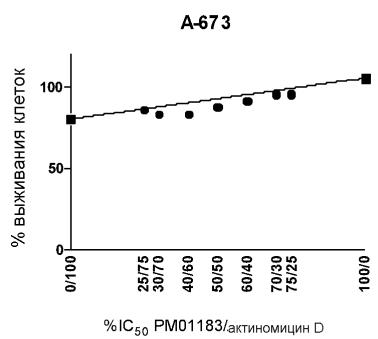
ФИГ. 27



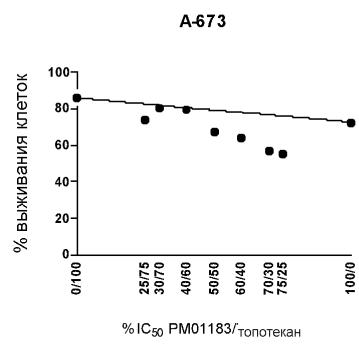
ФИГ. 28



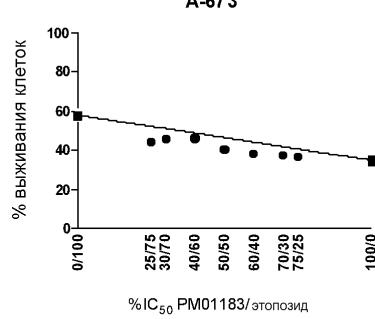
ФИГ. 29



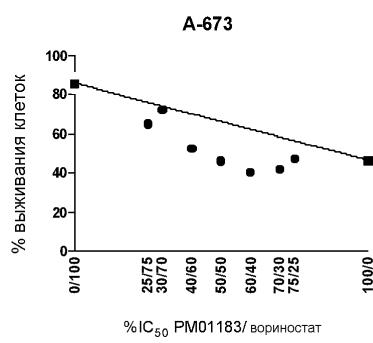
ФИГ. 30



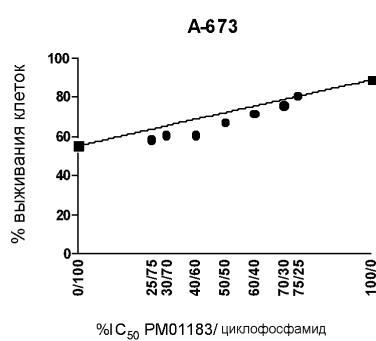
ФИГ. 31



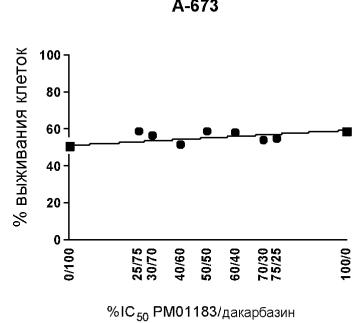
ФИГ. 32



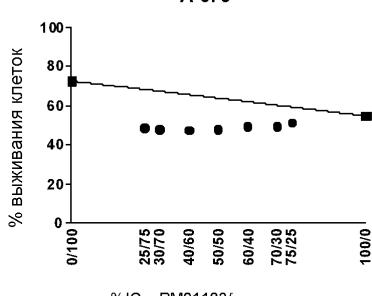
ФИГ. 33



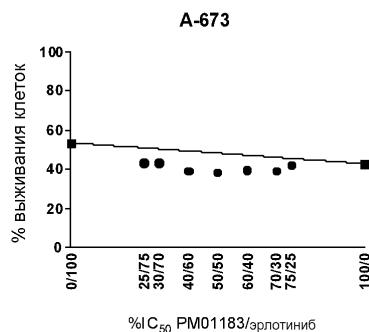
ФИГ. 34



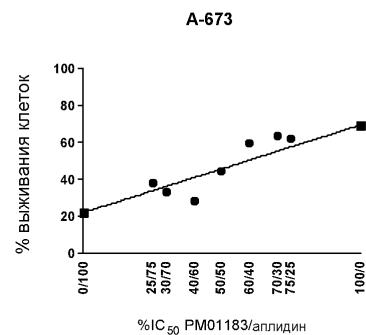
ФИГ. 35



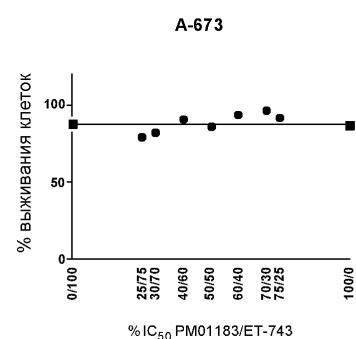
ФИГ. 36



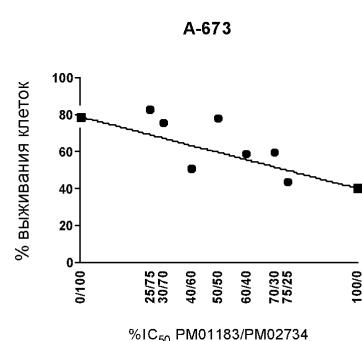
ФИГ. 37



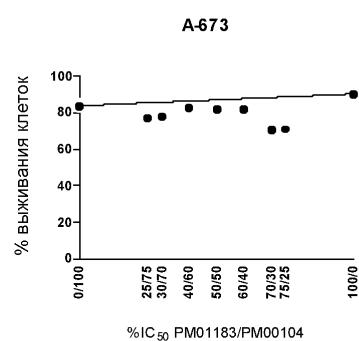
ФИГ. 38



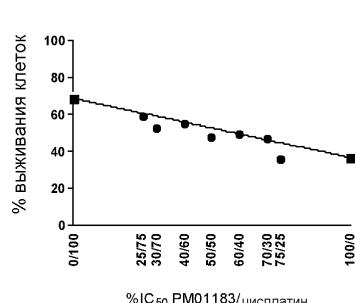
ФИГ. 39



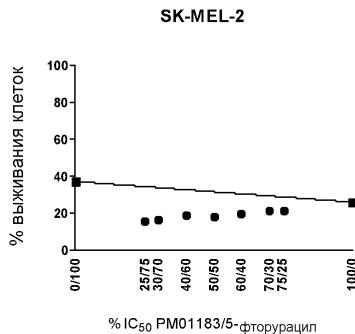
ФИГ. 40



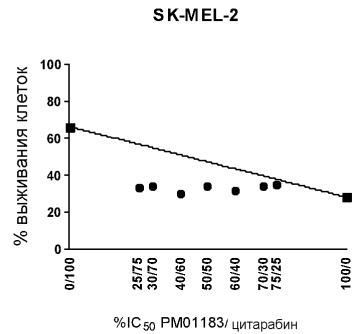
ФИГ. 41



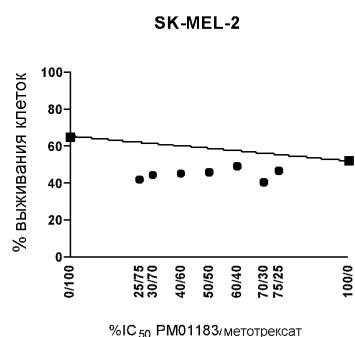
ФИГ. 42



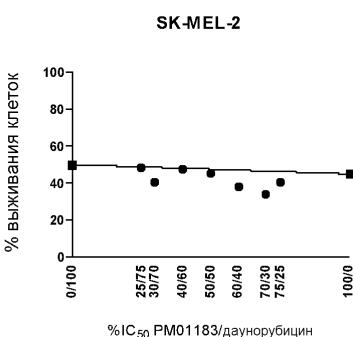
ФИГ. 43



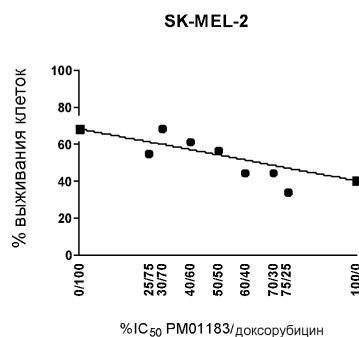
ФИГ. 44



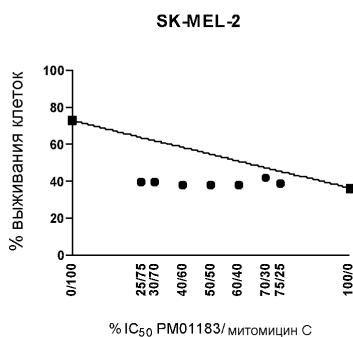
ФИГ. 45



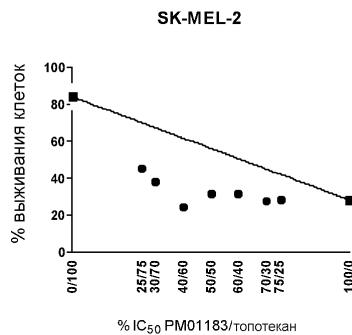
ФИГ. 46



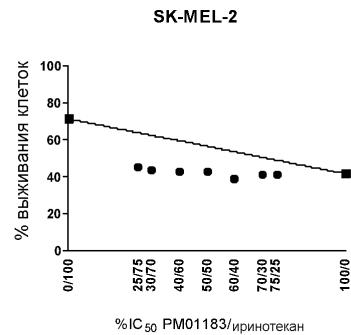
ФИГ. 47



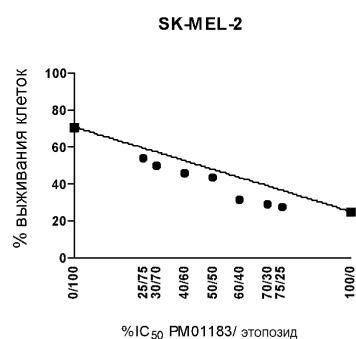
ФИГ. 48



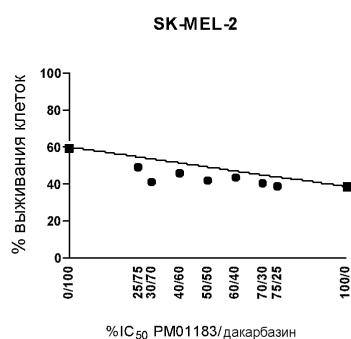
ФИГ. 49



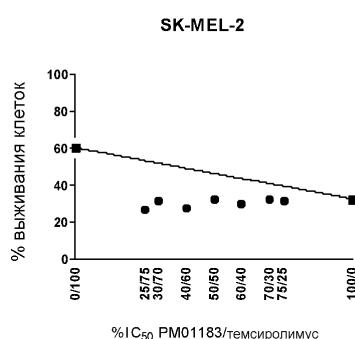
ФИГ. 50



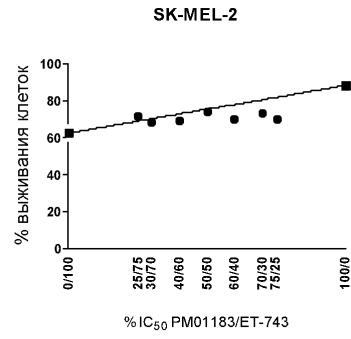
ФИГ. 51



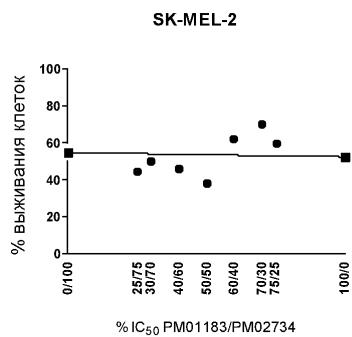
ФИГ. 52



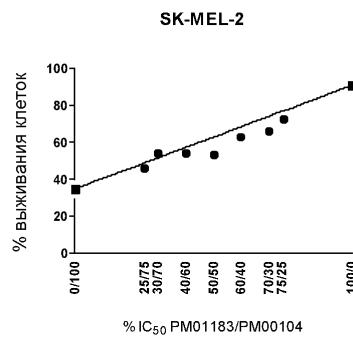
ФИГ. 53



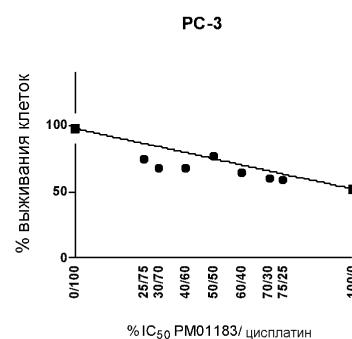
ФИГ. 54



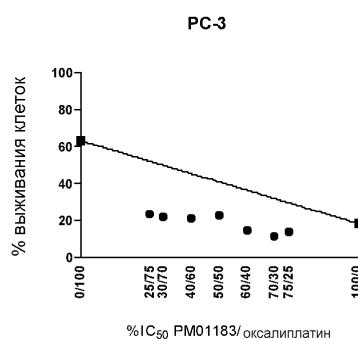
ФИГ. 55



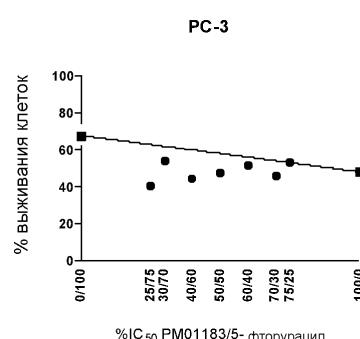
ФИГ. 56



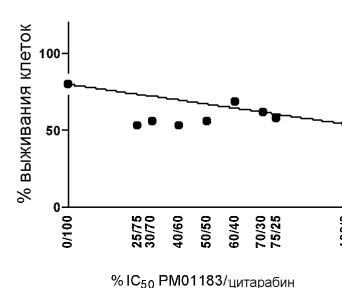
ФИГ. 57



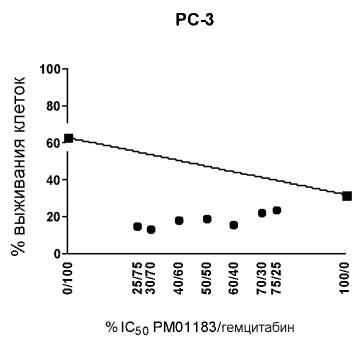
ФИГ. 58



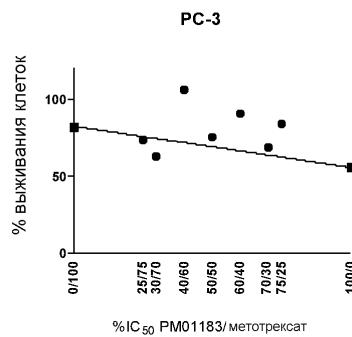
ФИГ. 59



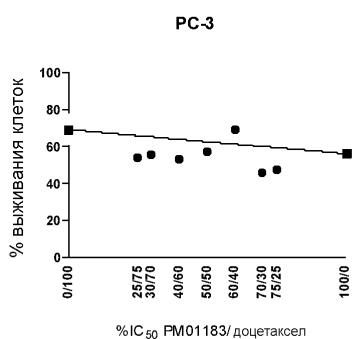
ФИГ. 60



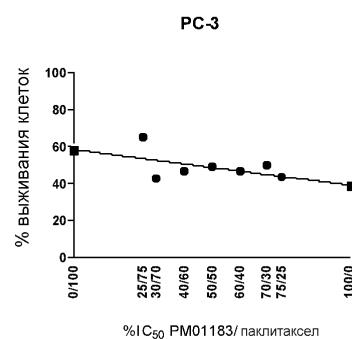
ФИГ. 61



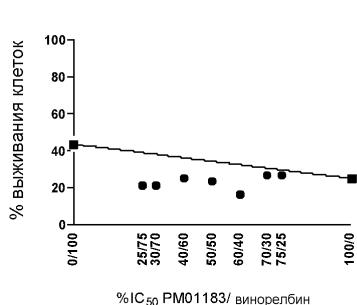
ФИГ. 62



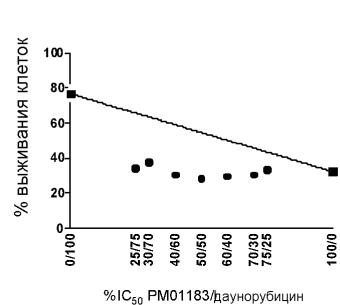
ФИГ. 63



ФИГ. 64

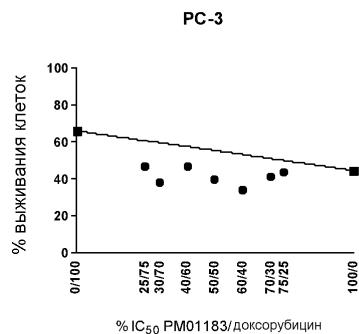


ФИГ. 65

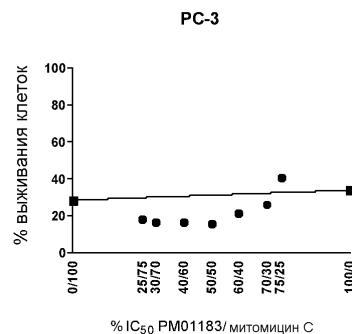


ФИГ. 66

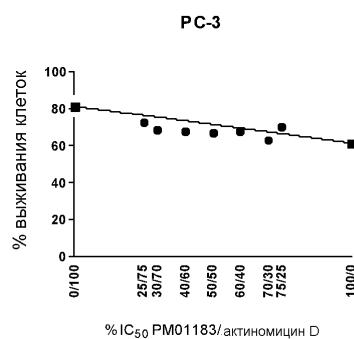
12/62



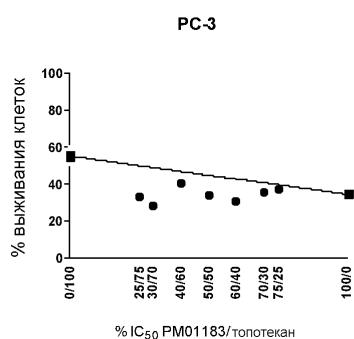
ФИГ. 67



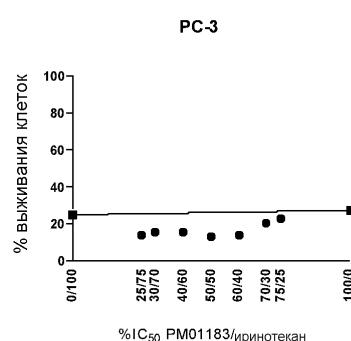
ФИГ. 68



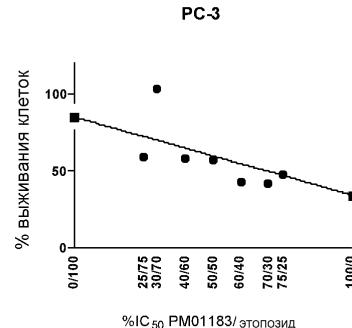
ФИГ. 69



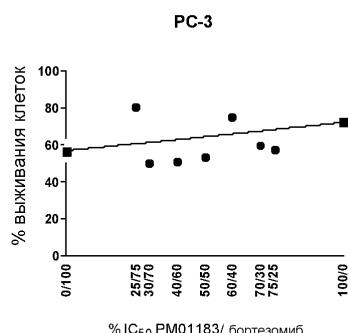
ФИГ. 70



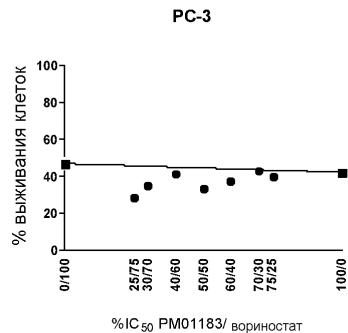
ФИГ. 71



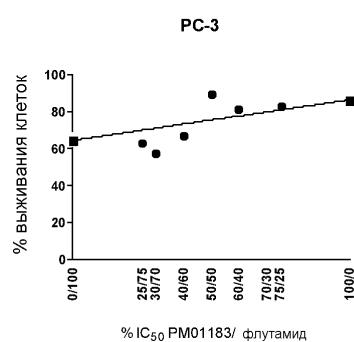
ФИГ. 72



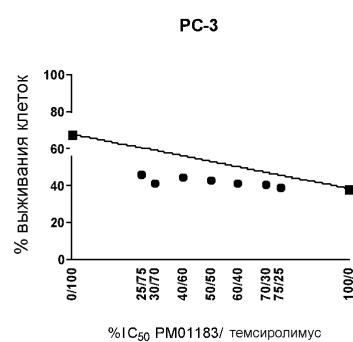
ФИГ. 73



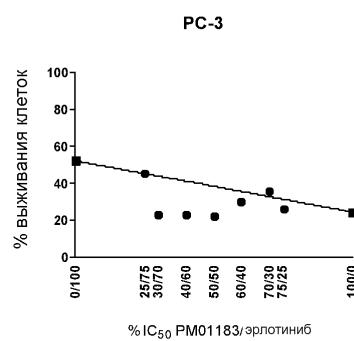
ФИГ. 74



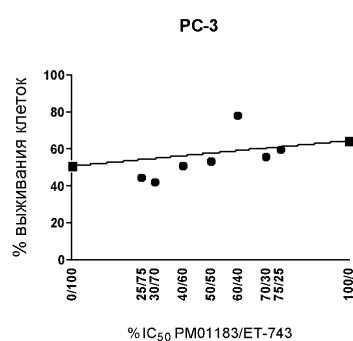
ФИГ. 75



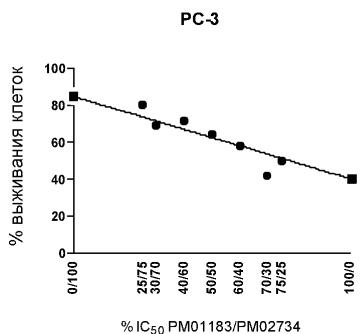
ФИГ. 76



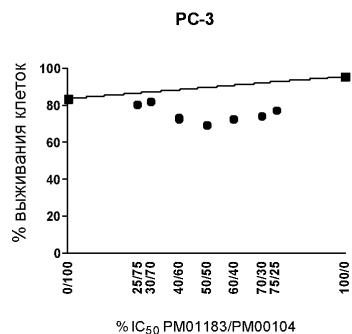
ФИГ. 77



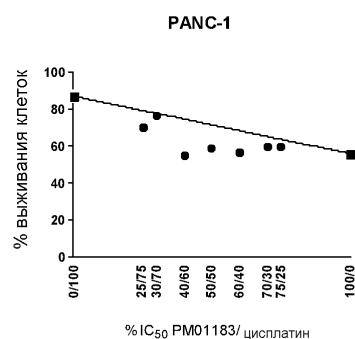
ФИГ. 78



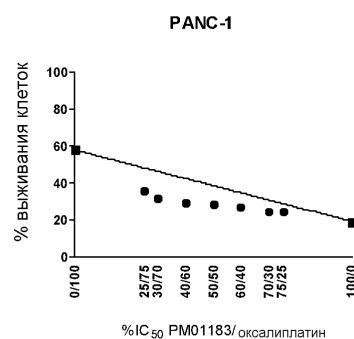
ФИГ. 79



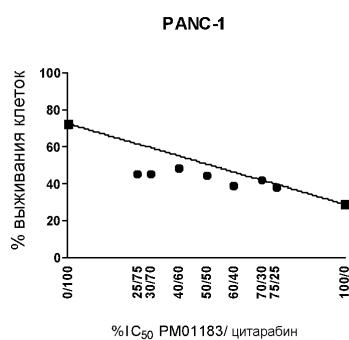
ФИГ. 80



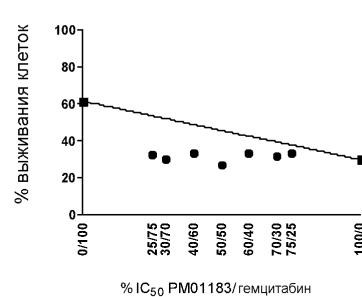
ФИГ. 81



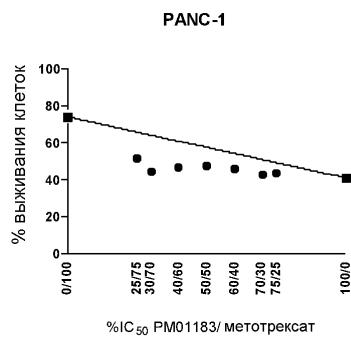
ФИГ. 82



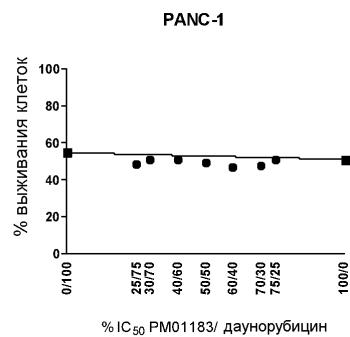
ФИГ. 83



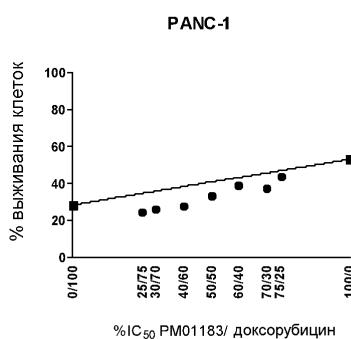
ФИГ. 84



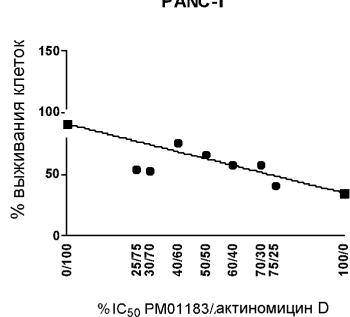
ФИГ. 85



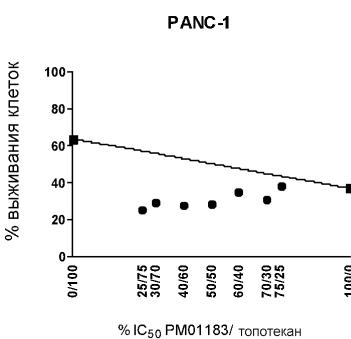
ФИГ. 86



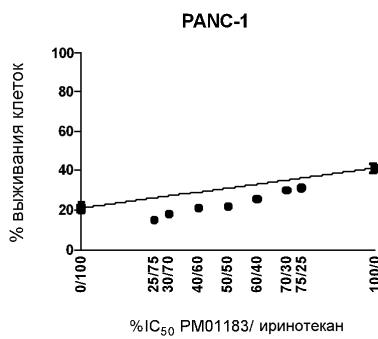
ФИГ. 87



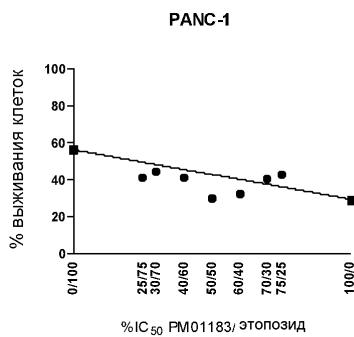
ФИГ. 88



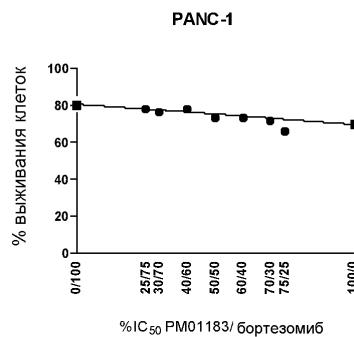
ФИГ. 89



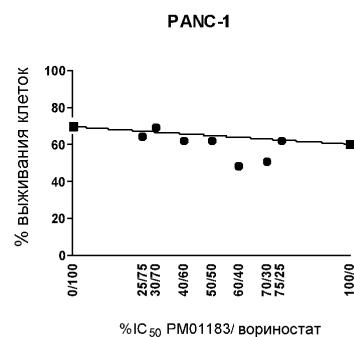
ФИГ. 90



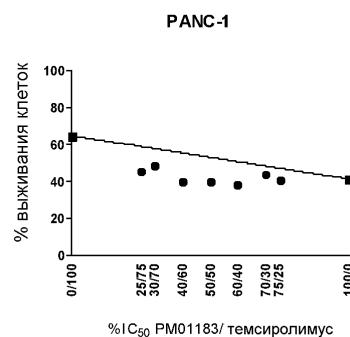
ФИГ. 91



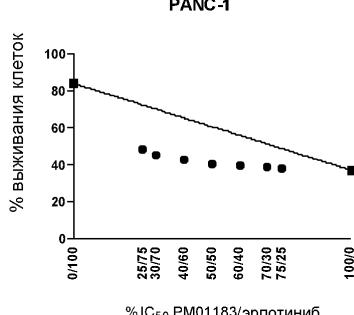
ФИГ. 92



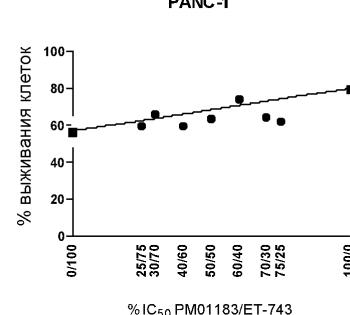
ФИГ. 93



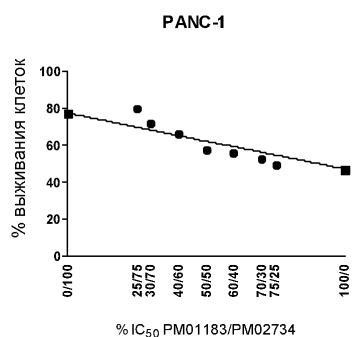
ФИГ. 94



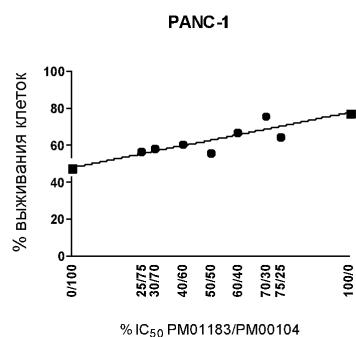
ФИГ. 95



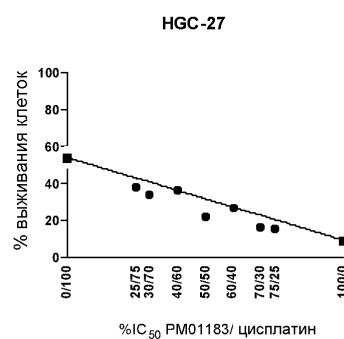
ФИГ. 96



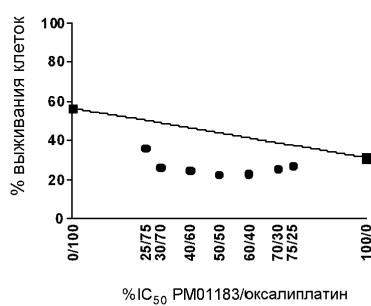
ФИГ. 97



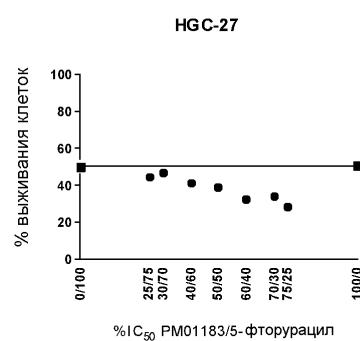
ФИГ. 98



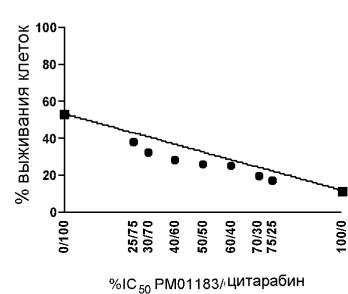
ФИГ. 99



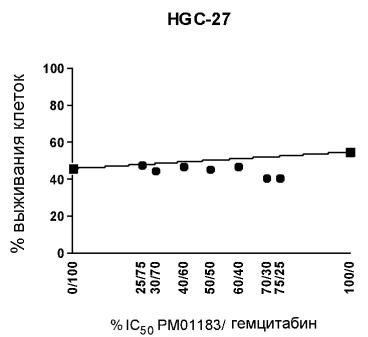
ФИГ. 100



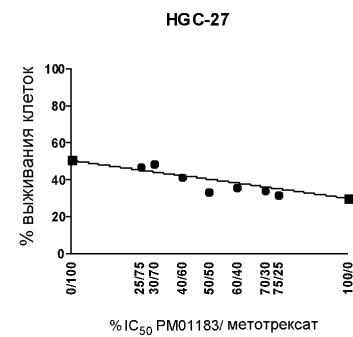
ФИГ. 101



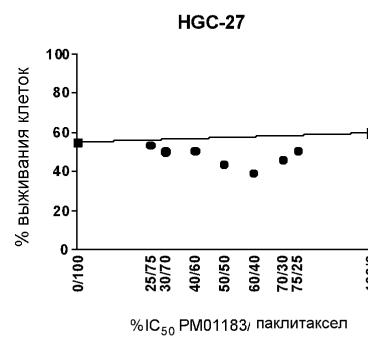
ФИГ. 102



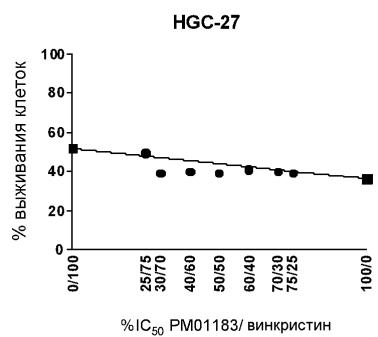
ФИГ. 103



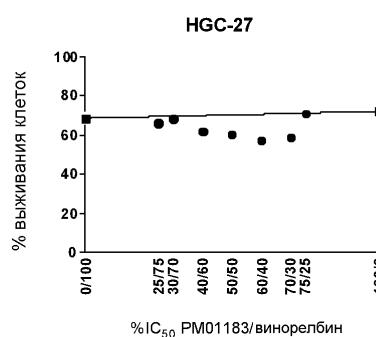
ФИГ. 104



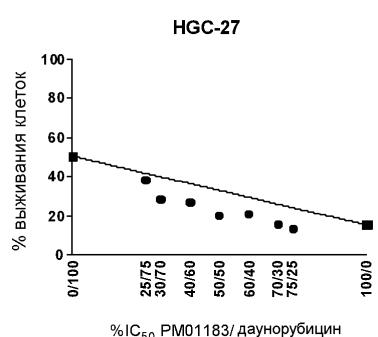
ФИГ. 105



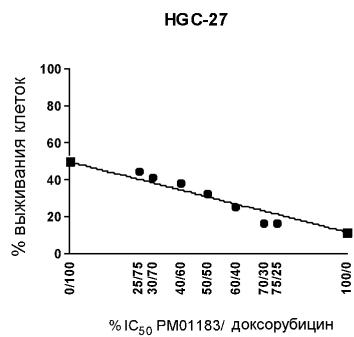
ФИГ. 106



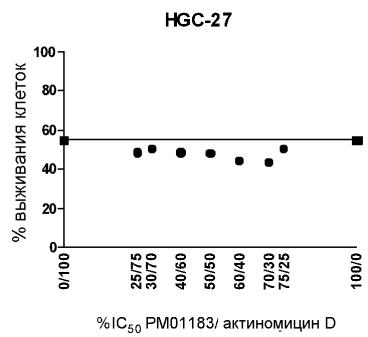
ФИГ. 107



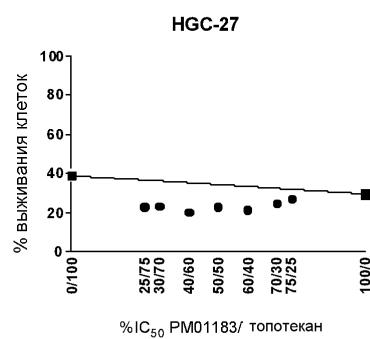
ФИГ. 108



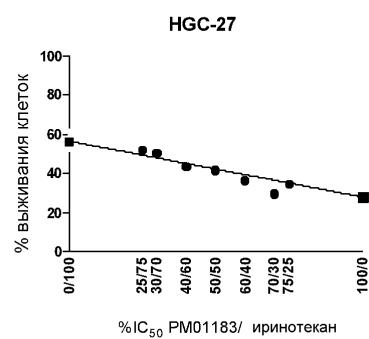
ФИГ. 109



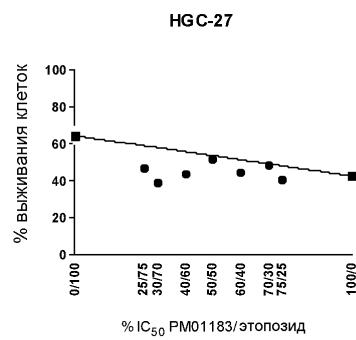
ФИГ. 110



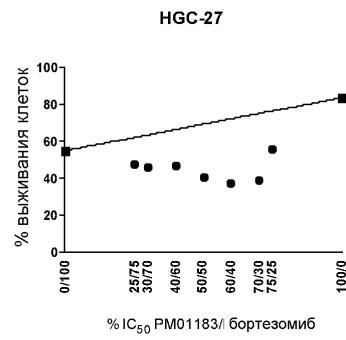
ФИГ. 111



ФИГ. 112

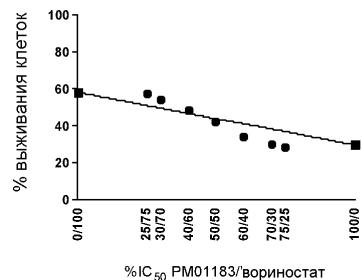


ФИГ. 113



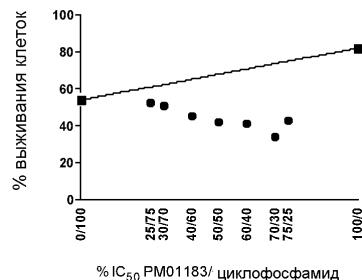
ФИГ. 114

HGC-27



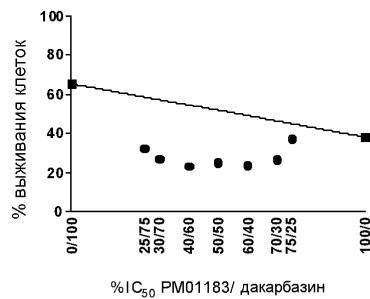
ФИГ. 115

HGC-27



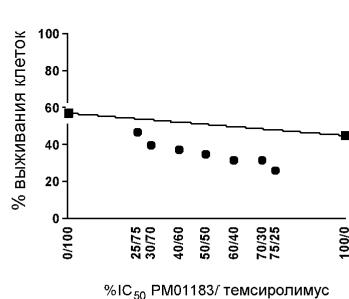
ФИГ. 116

HGC-27



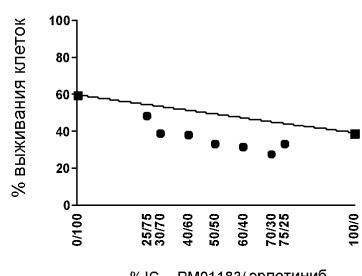
ФИГ. 117

HGC-27



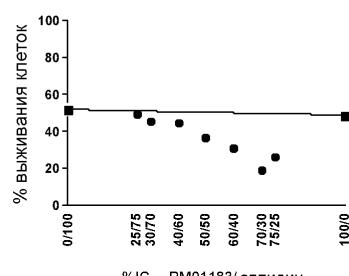
ФИГ. 118

HGC-27

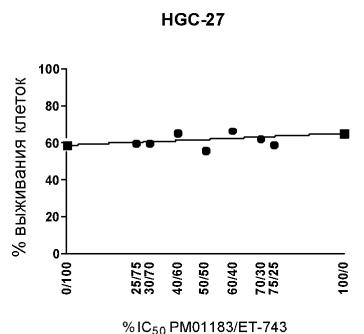


ФИГ. 119

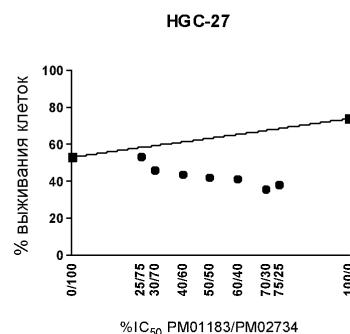
HGC-27



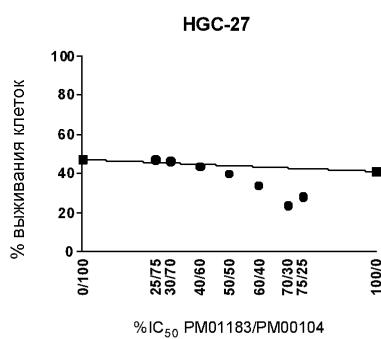
ФИГ. 120



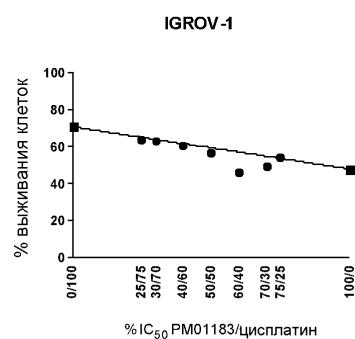
ФИГ. 121



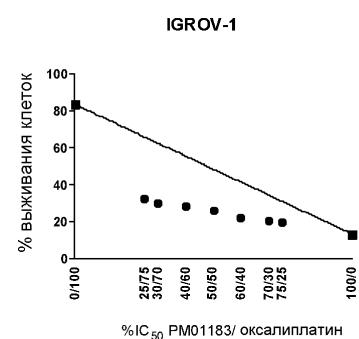
ФИГ. 122



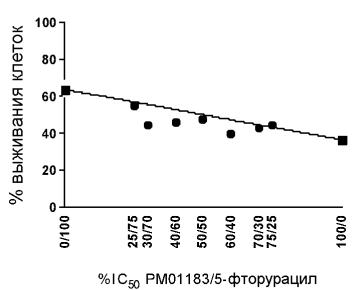
ФИГ. 123



ФИГ. 124

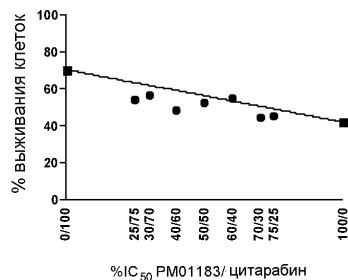


ФИГ. 125



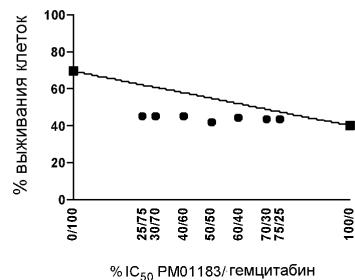
ФИГ. 126

IGROV-1



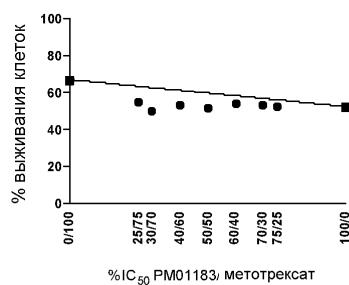
ФИГ. 127

IGROV-1



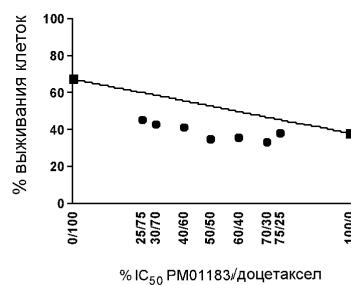
ФИГ. 128

IGROV-1



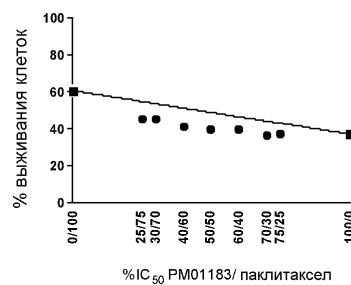
ФИГ. 129

IGROV-1



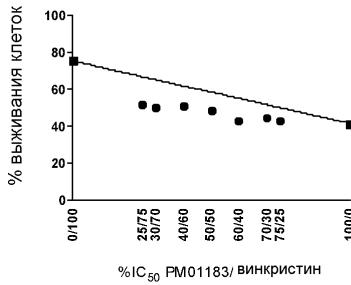
ФИГ. 130

IGROV-1

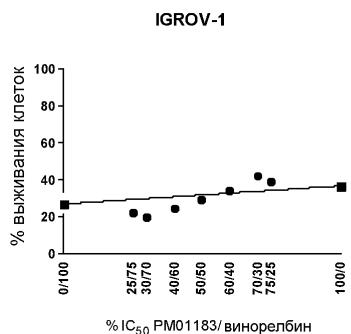


ФИГ. 131

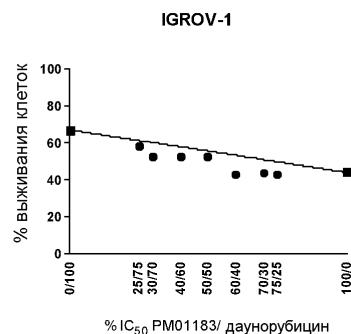
IGROV-1



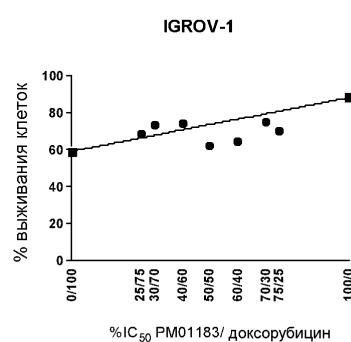
ФИГ. 132



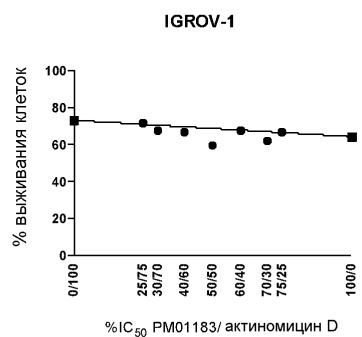
ФИГ. 133



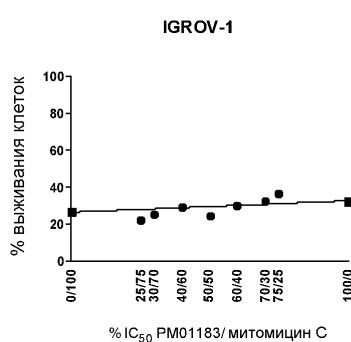
ФИГ. 134



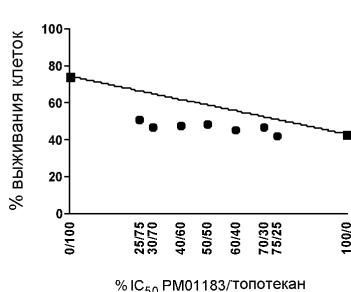
ФИГ. 135



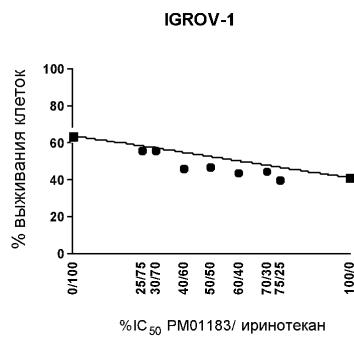
ФИГ. 136



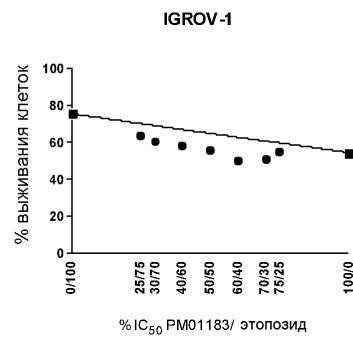
ФИГ. 137



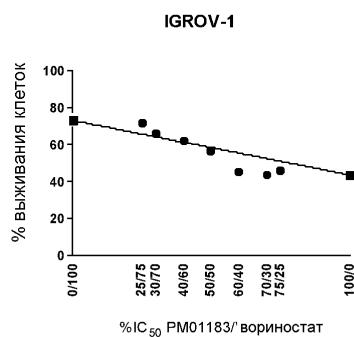
ФИГ. 138



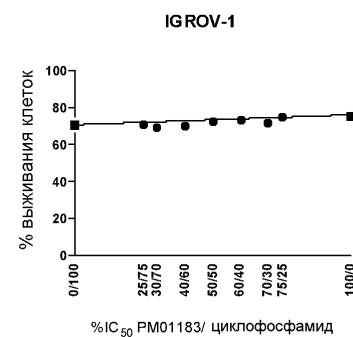
ФИГ. 139



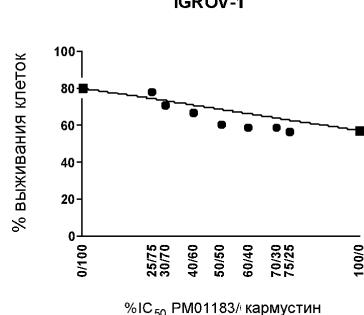
ФИГ. 140



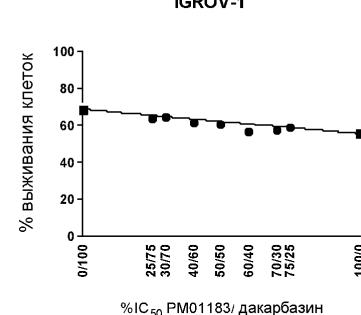
ФИГ. 141



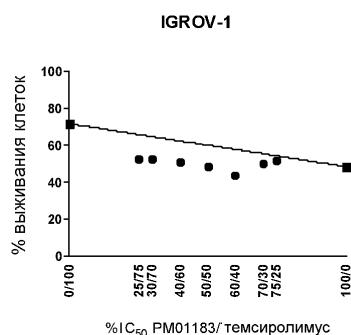
ФИГ. 142



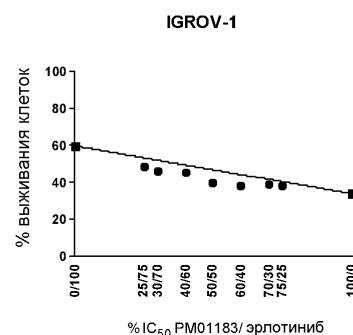
ФИГ. 143



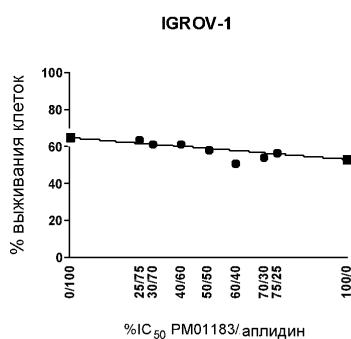
ФИГ. 144



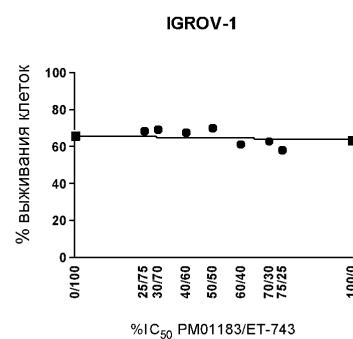
ФИГ. 145



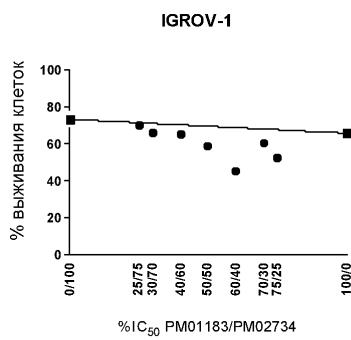
ФИГ. 146



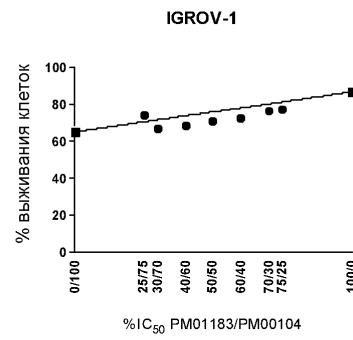
ФИГ. 147



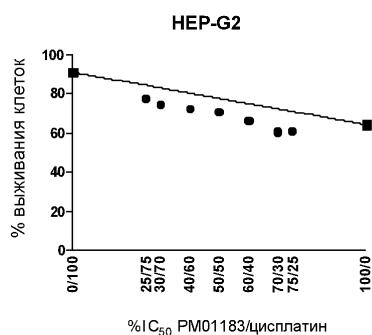
ФИГ. 148



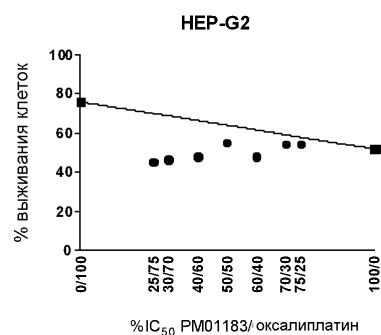
ФИГ. 149



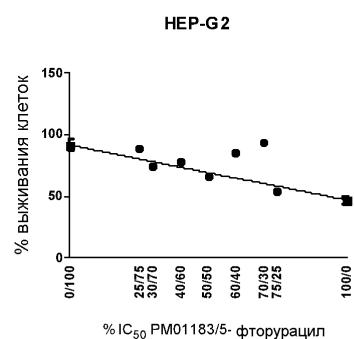
ФИГ. 150



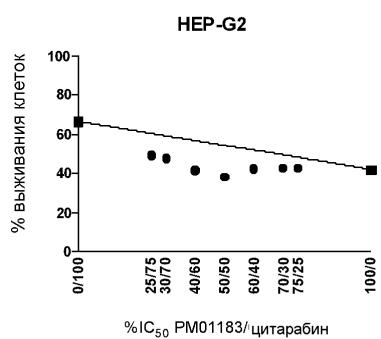
ФИГ. 151



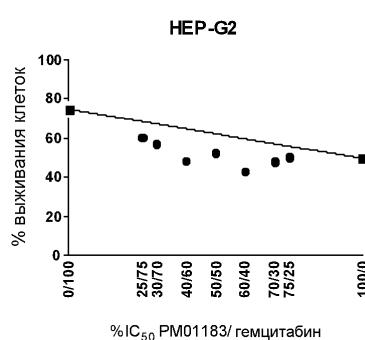
ФИГ. 152



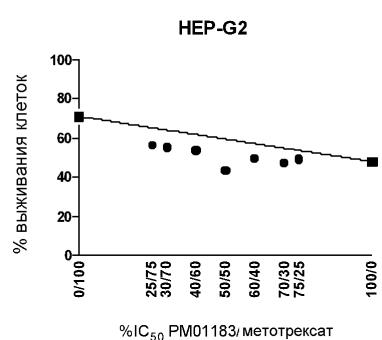
ФИГ. 153



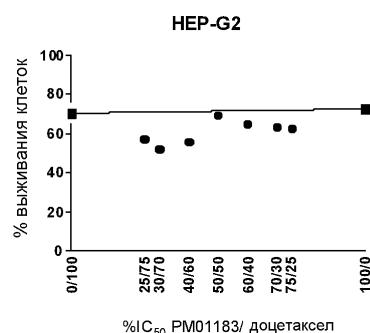
ФИГ. 154



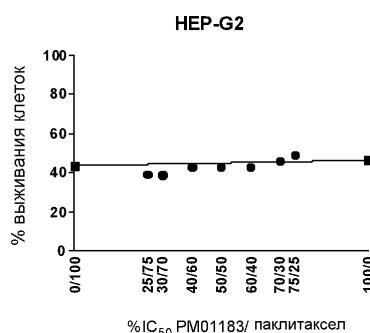
ФИГ. 155



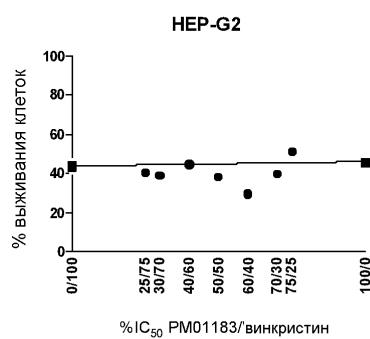
ФИГ. 156



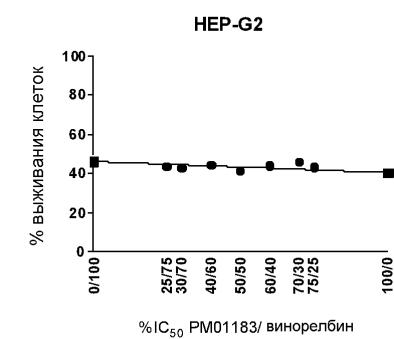
ФИГ. 157



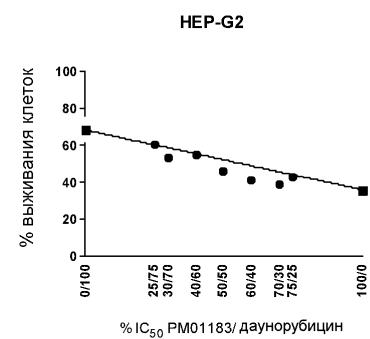
ФИГ. 158



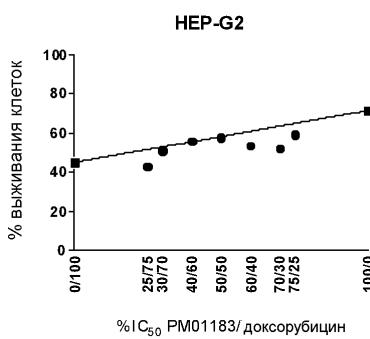
ФИГ. 159



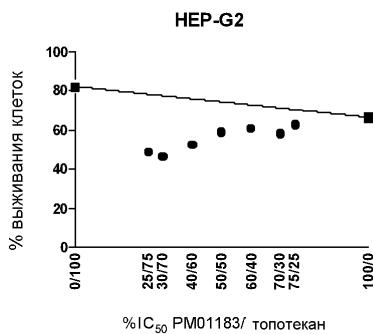
ФИГ. 160



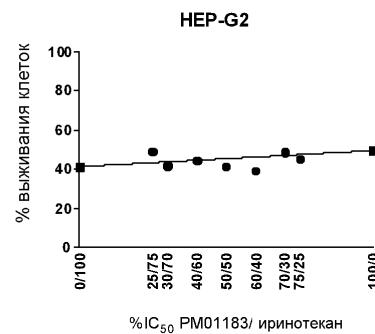
ФИГ. 161



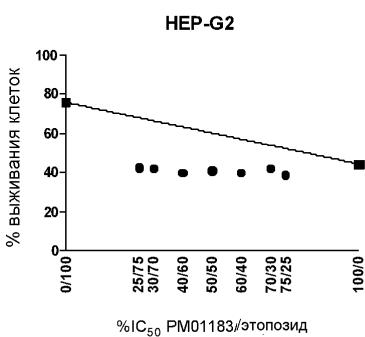
ФИГ. 162



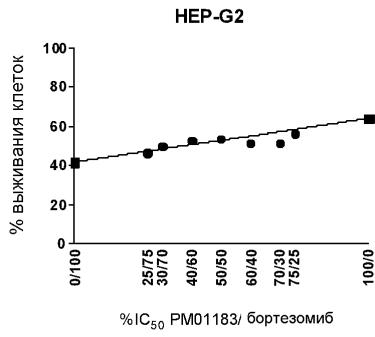
ФИГ. 163



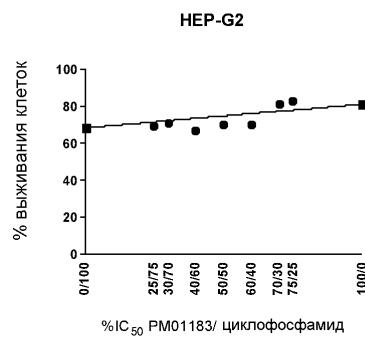
ФИГ. 164



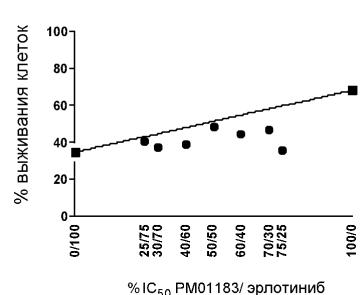
ФИГ. 165



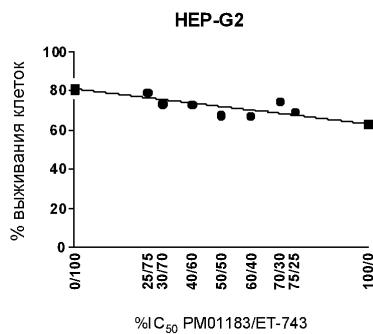
ФИГ. 166



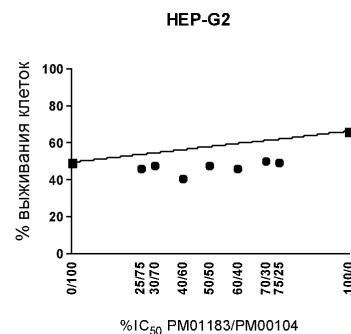
ФИГ. 167



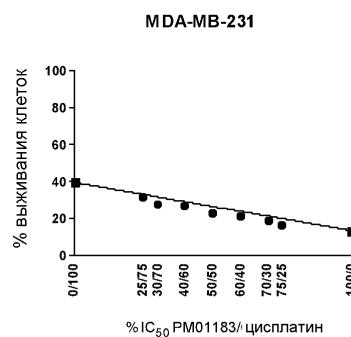
ФИГ. 168



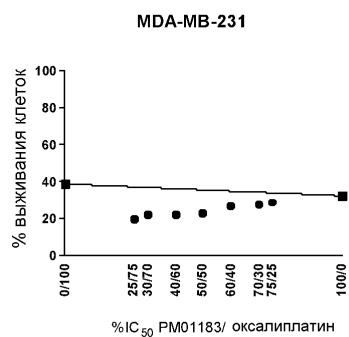
ФИГ. 169



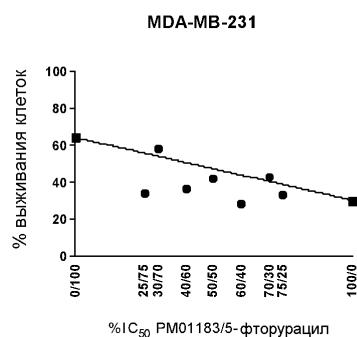
ФИГ. 170



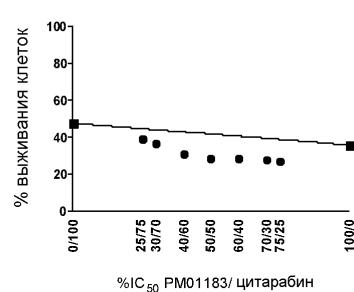
ФИГ. 171



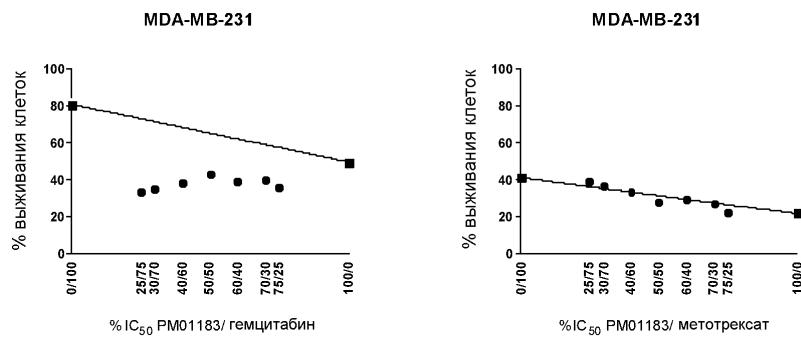
ФИГ. 172



ФИГ. 173

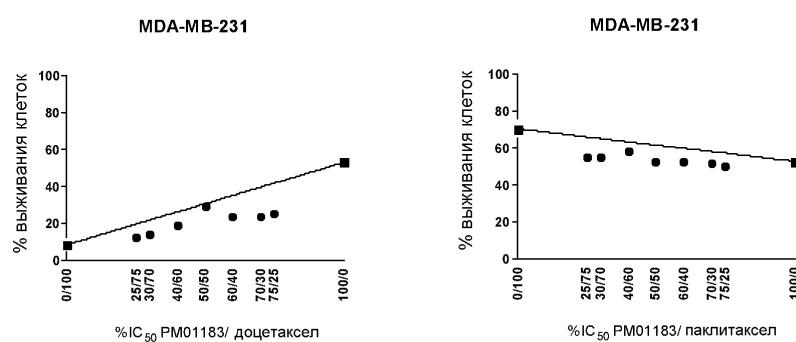


ФИГ. 174



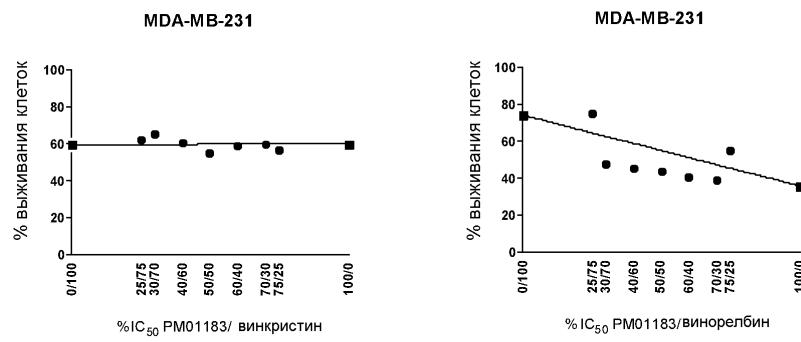
ФИГ. 175

ФИГ. 176



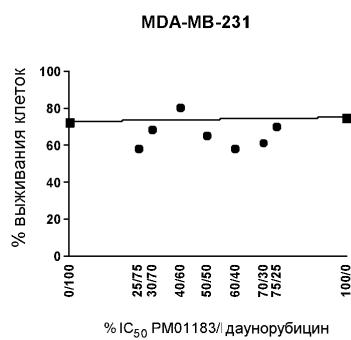
ФИГ. 177

ФИГ. 178

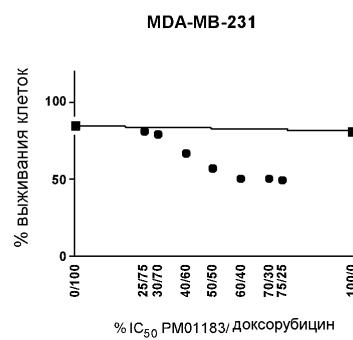


ФИГ. 179

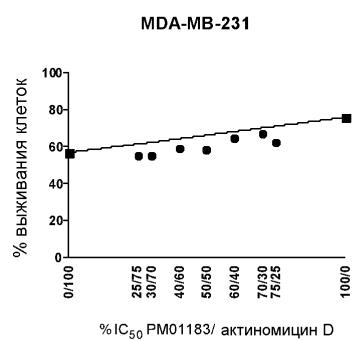
ФИГ. 180



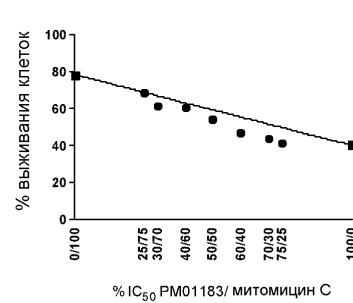
ФИГ. 181



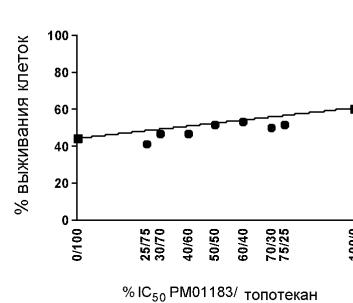
ФИГ. 182



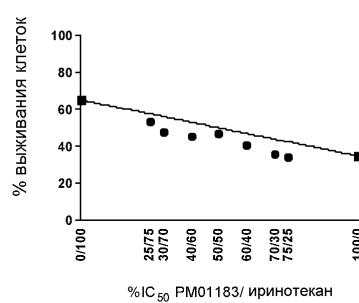
ФИГ. 183



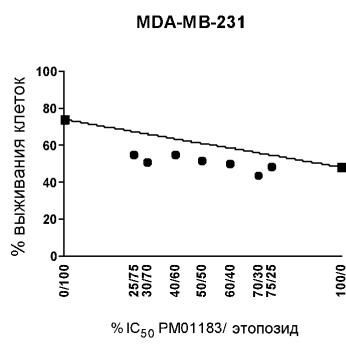
ФИГ. 184



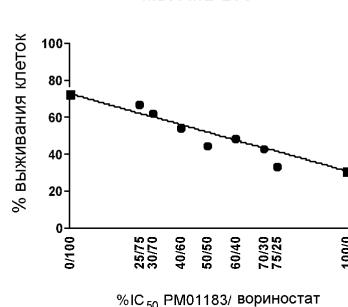
ФИГ. 185



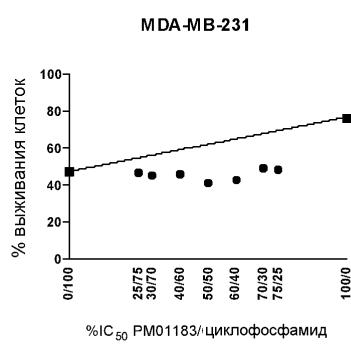
ФИГ. 186



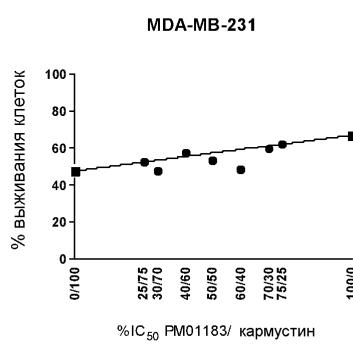
ФИГ. 187



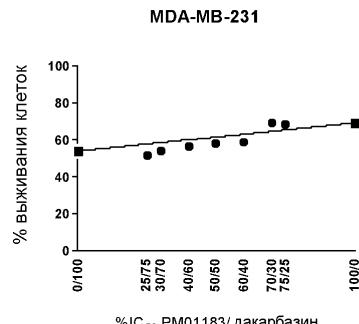
ФИГ. 188



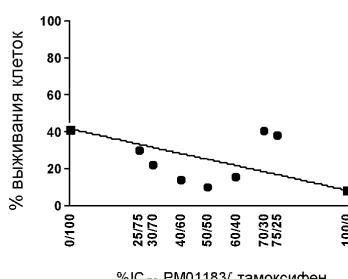
ФИГ. 189



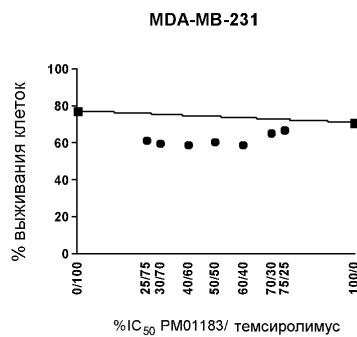
ФИГ. 190



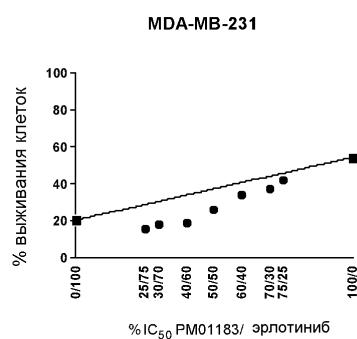
ФИГ. 191



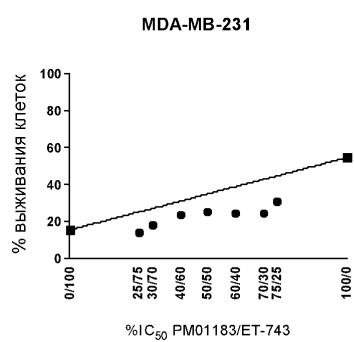
ФИГ. 192



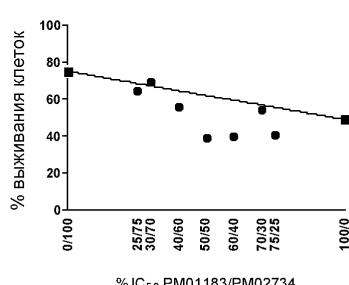
ФИГ. 193



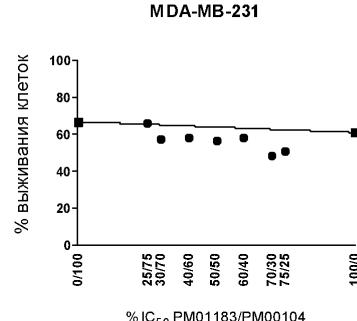
ФИГ. 194



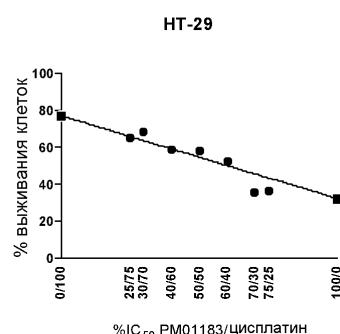
ФИГ. 195



ФИГ. 196

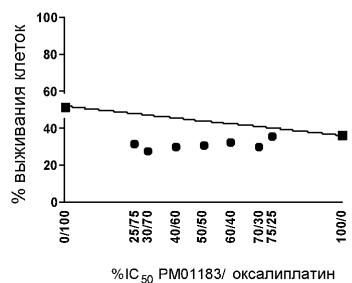


ФИГ. 197

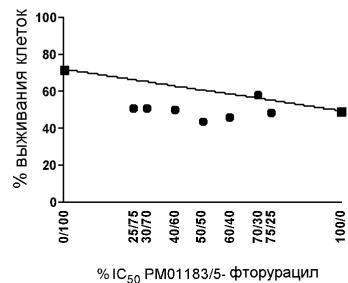


ФИГ. 198

HT-29



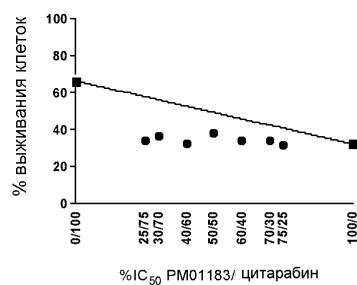
HT-29



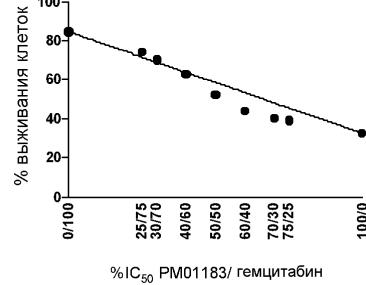
ФИГ. 199

ФИГ. 200

HT-29



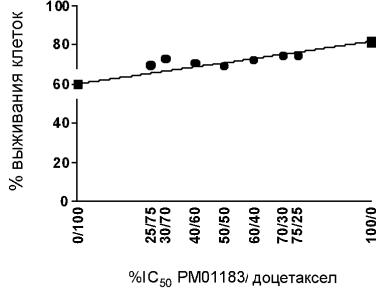
HT-29



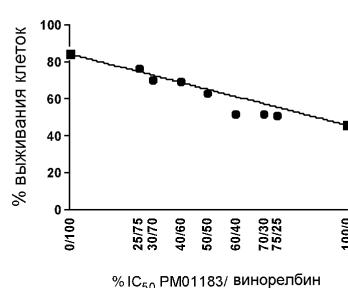
ФИГ. 201

ФИГ. 202

HT-29



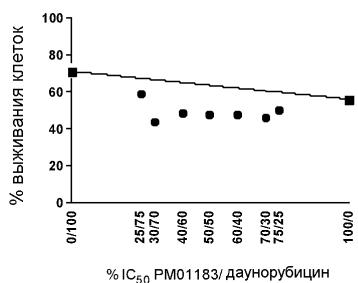
HT-29



ФИГ. 203

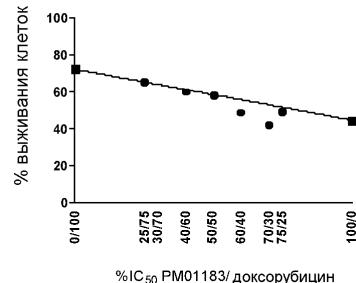
ФИГ. 204

HT-29



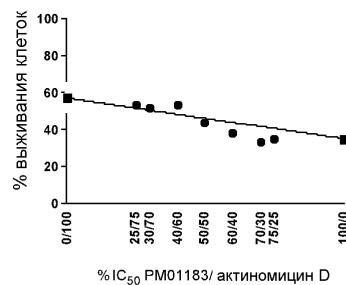
ФИГ. 205

HT-29



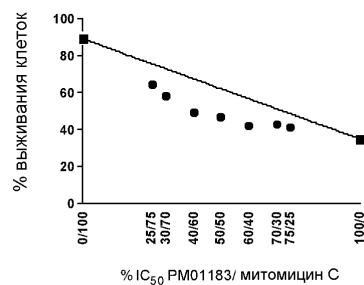
ФИГ. 206

HT-29



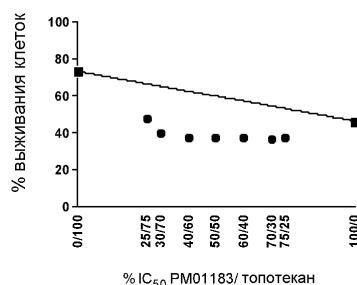
ФИГ. 207

HT-29



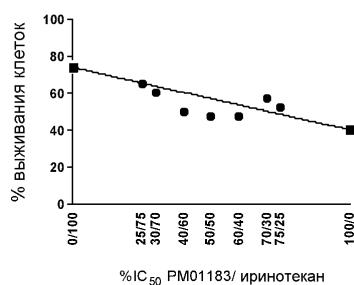
ФИГ. 208

HT-29

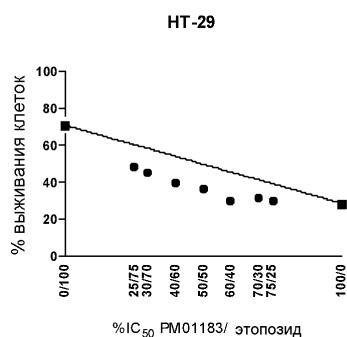


ФИГ. 209

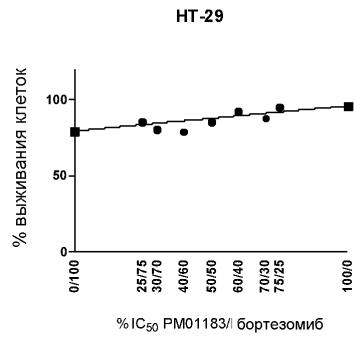
HT-29



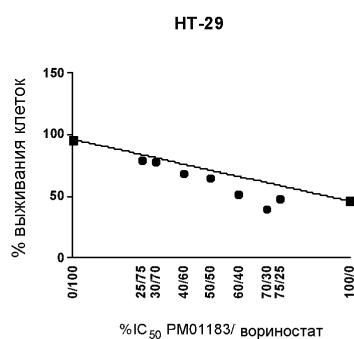
ФИГ. 210



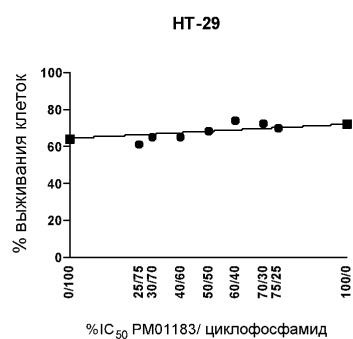
ФИГ. 211



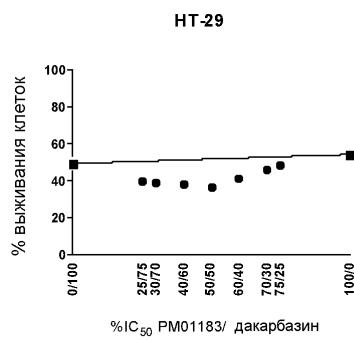
ФИГ. 212



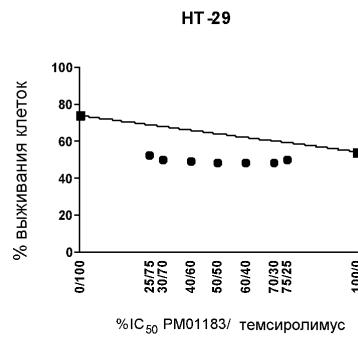
ФИГ. 213



ФИГ. 214

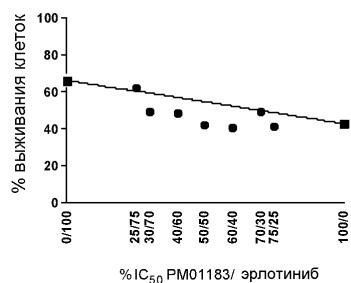


ФИГ. 215



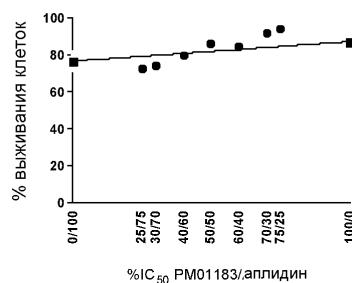
ФИГ. 216

НТ-29

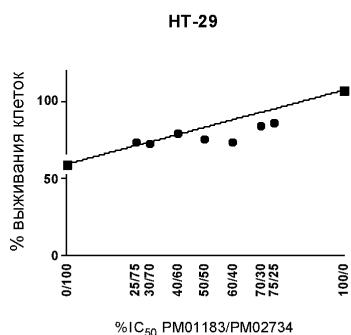


ФИГ. 217

НТ-29

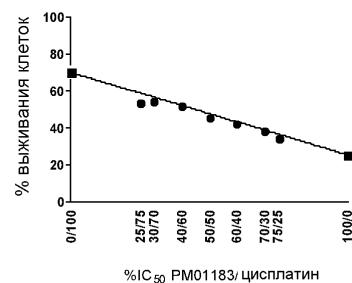


ФИГ. 218

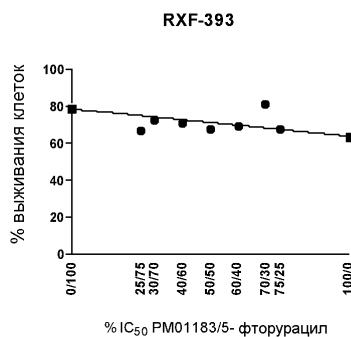


ФИГ. 219

RXF-393

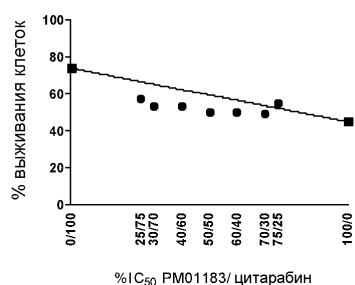


ФИГ. 220

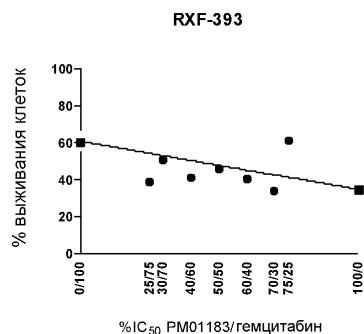


ФИГ. 221

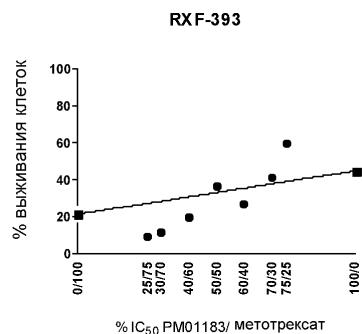
RXF-393



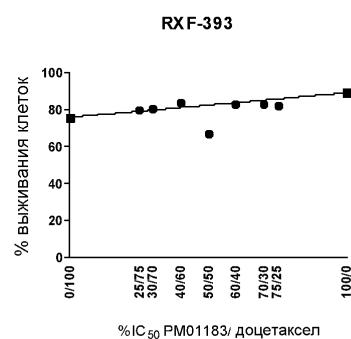
ФИГ. 222



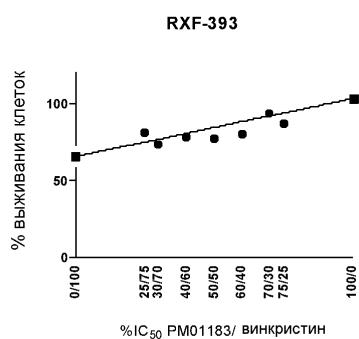
ФИГ. 223



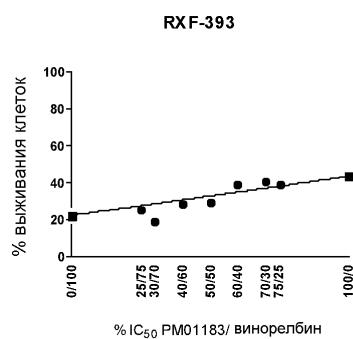
ФИГ. 224



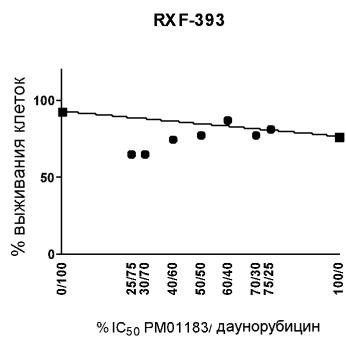
ФИГ. 225



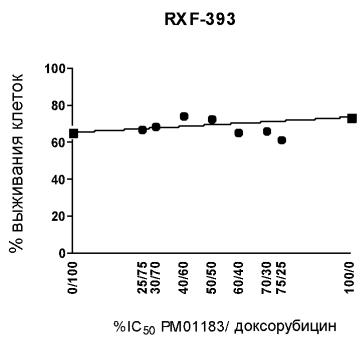
ФИГ. 226



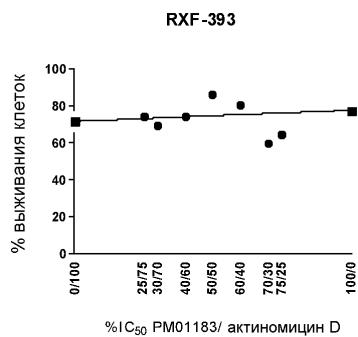
ФИГ. 227



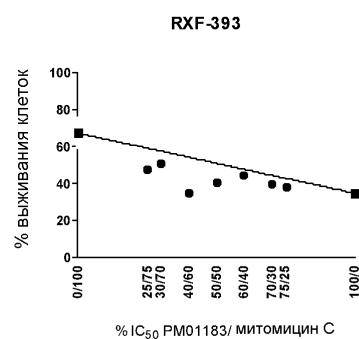
ФИГ. 228



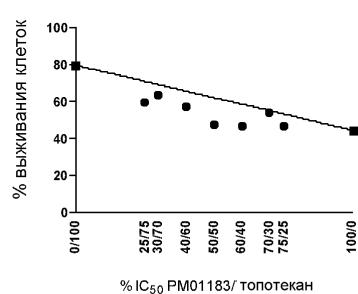
ФИГ. 229



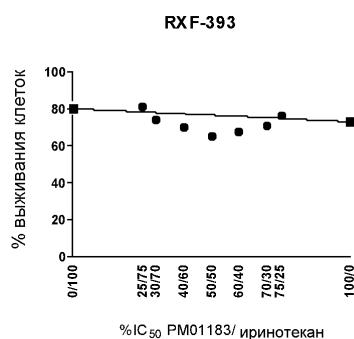
ФИГ. 230



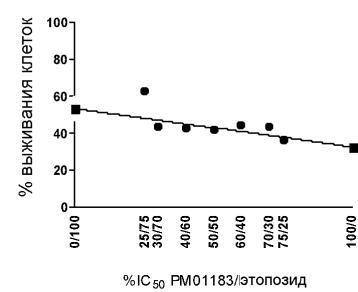
ФИГ. 231



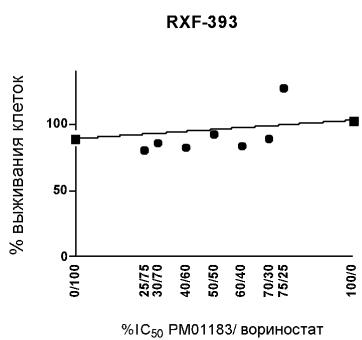
ФИГ. 232



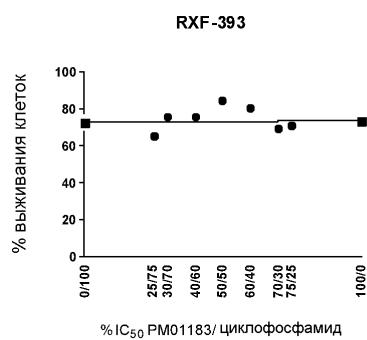
ФИГ. 233



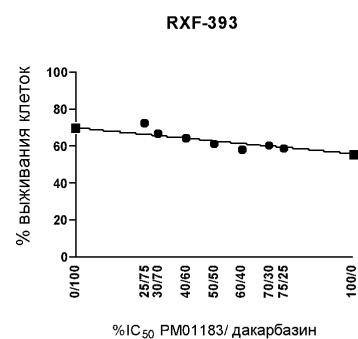
ФИГ. 234



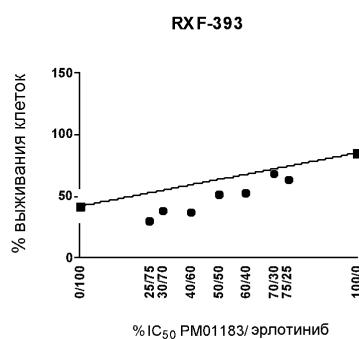
ФИГ. 235



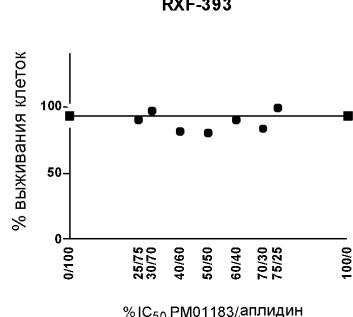
ФИГ. 236



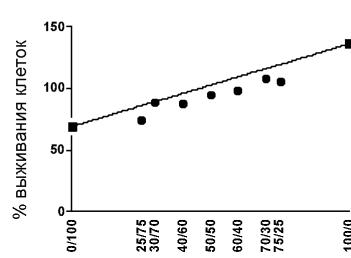
ФИГ. 237



ФИГ. 238

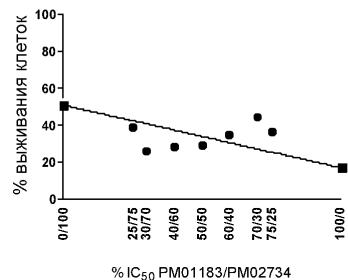


ФИГ. 239



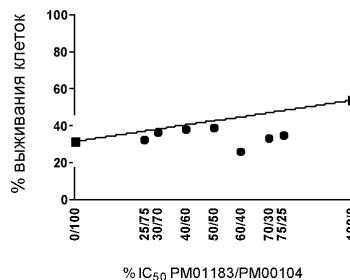
ФИГ. 240

RXF-393



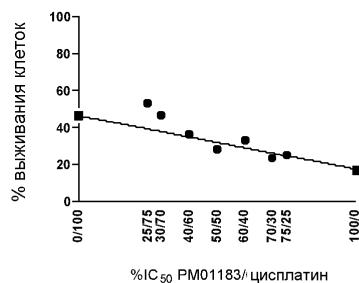
ФИГ. 241

RXF-393



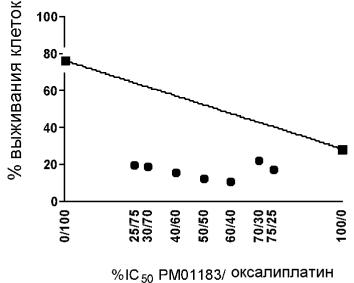
ФИГ. 242

U87-MG



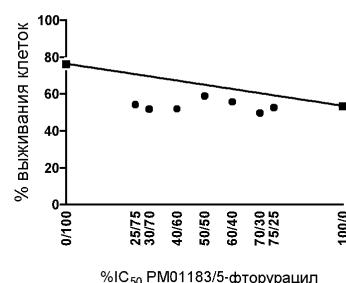
ФИГ. 243

U87-MG



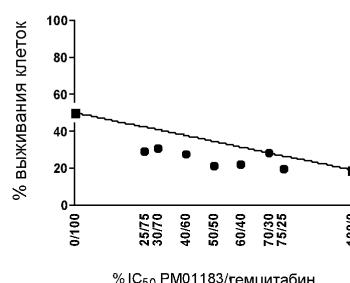
ФИГ. 244

U87-MG

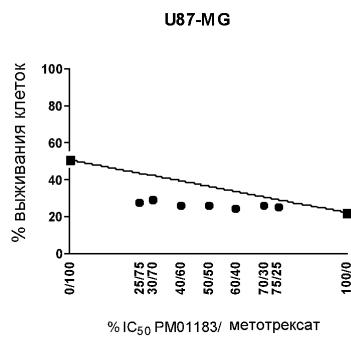


ФИГ. 245

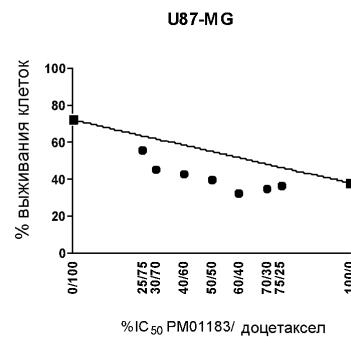
U87-MG



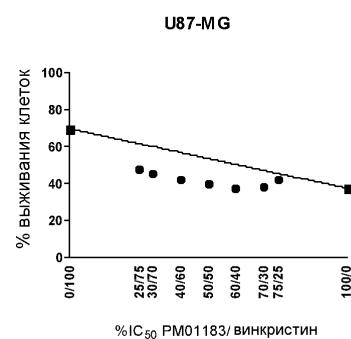
ФИГ. 246



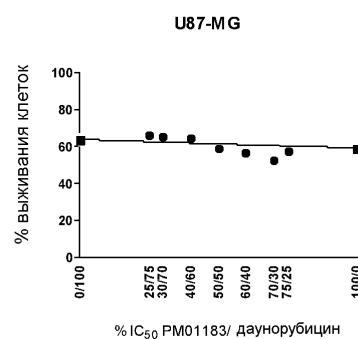
ФИГ. 247



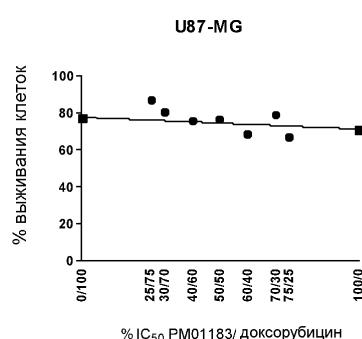
ФИГ. 248



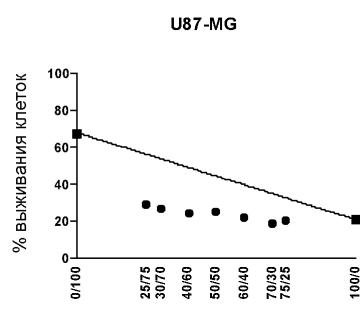
ФИГ. 249



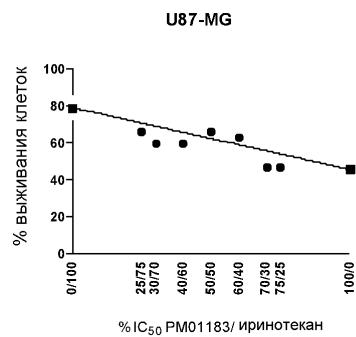
ФИГ. 250



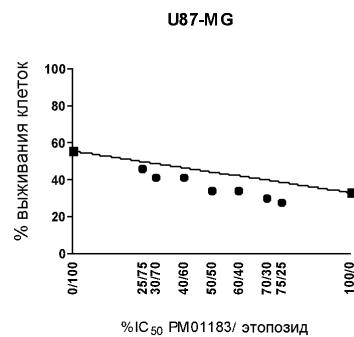
ФИГ. 251



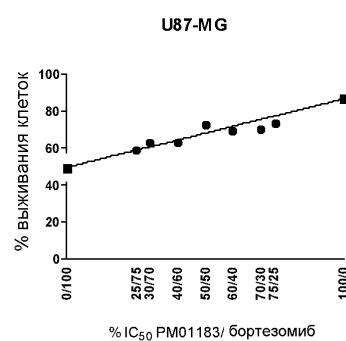
ФИГ. 252



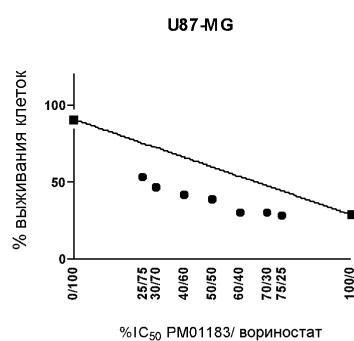
ФИГ. 253



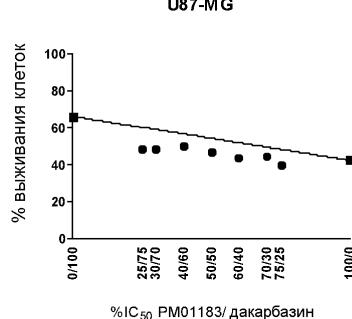
ФИГ. 254



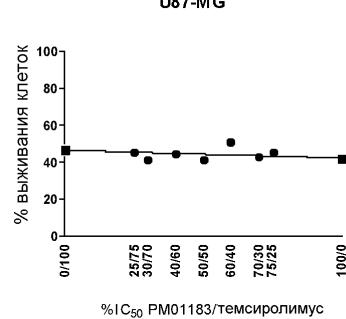
ФИГ. 255



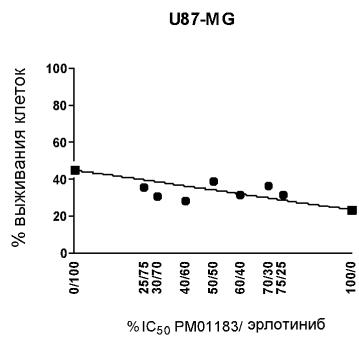
ФИГ. 256



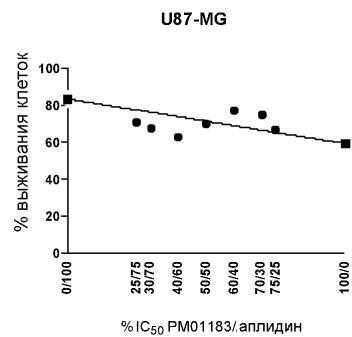
ФИГ. 257



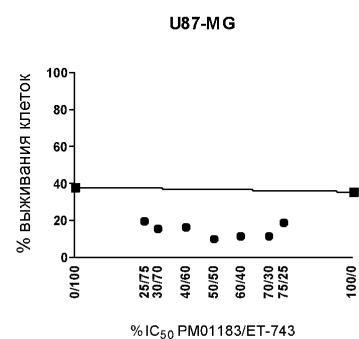
ФИГ. 258



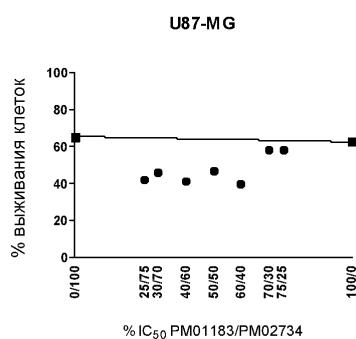
ФИГ. 259



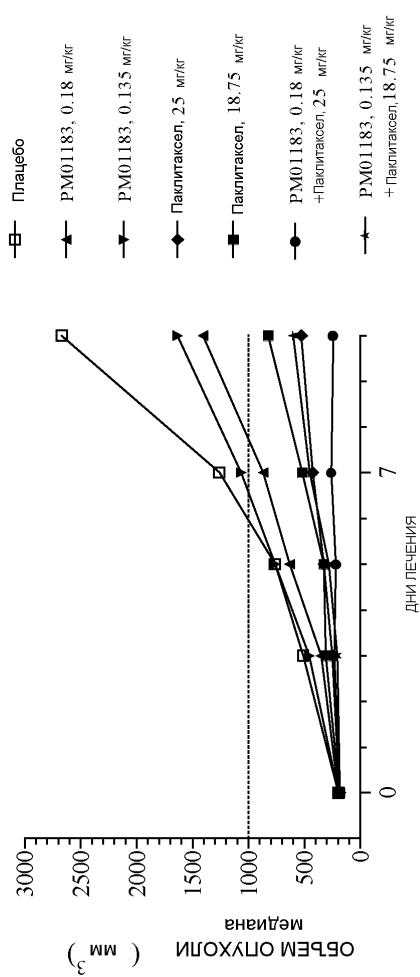
ФИГ. 260



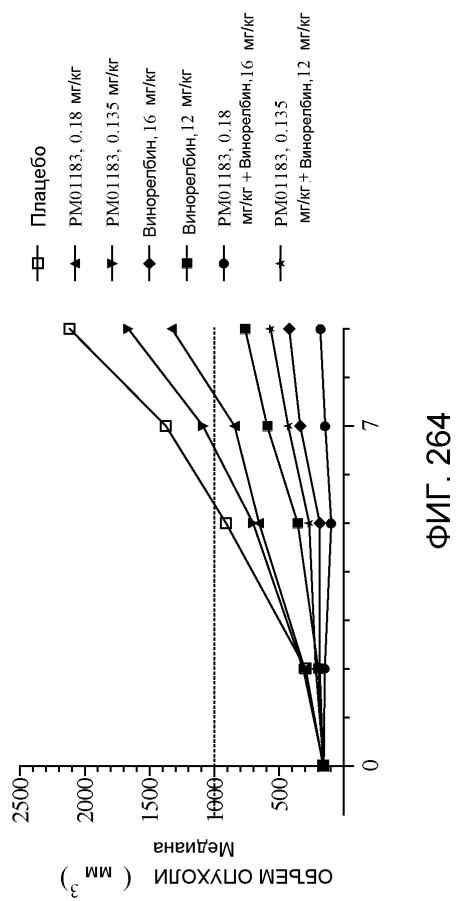
ФИГ. 261

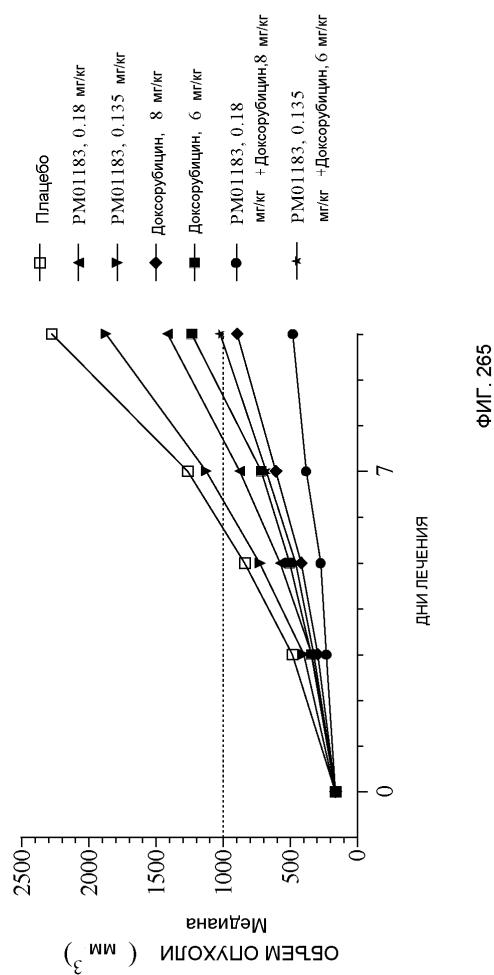


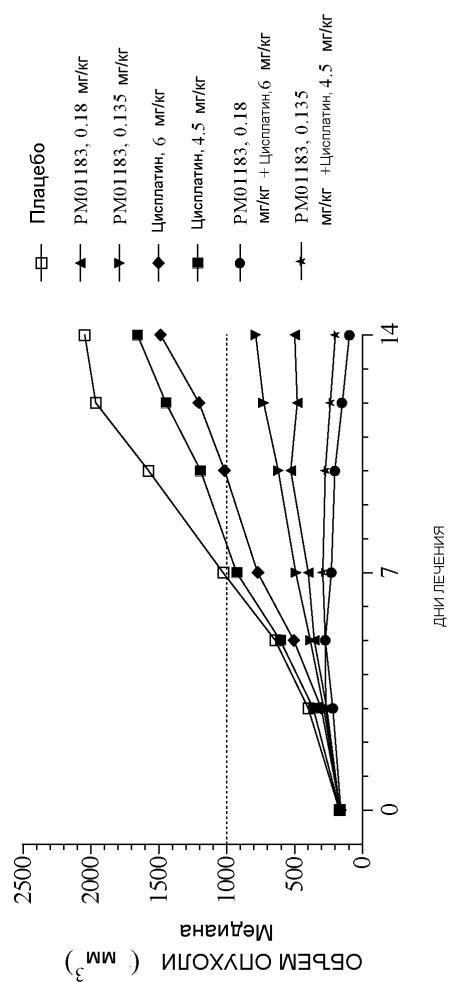
ФИГ. 262



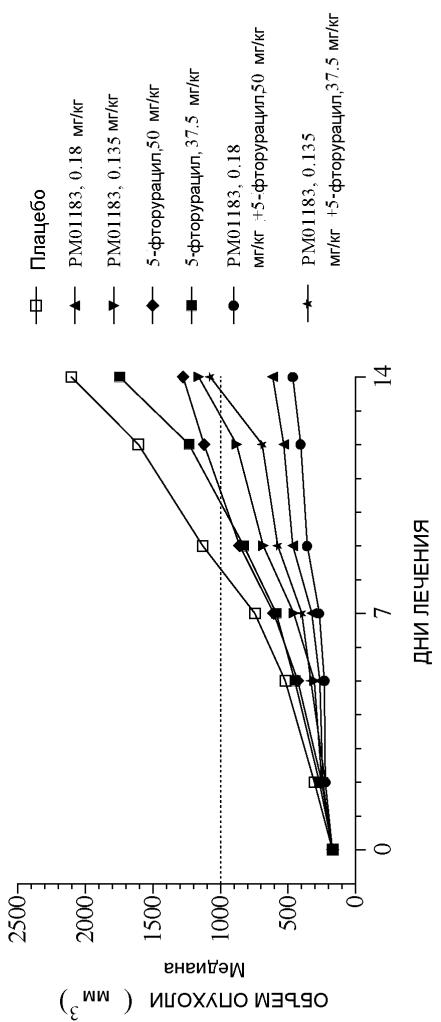
ФИГ. 263



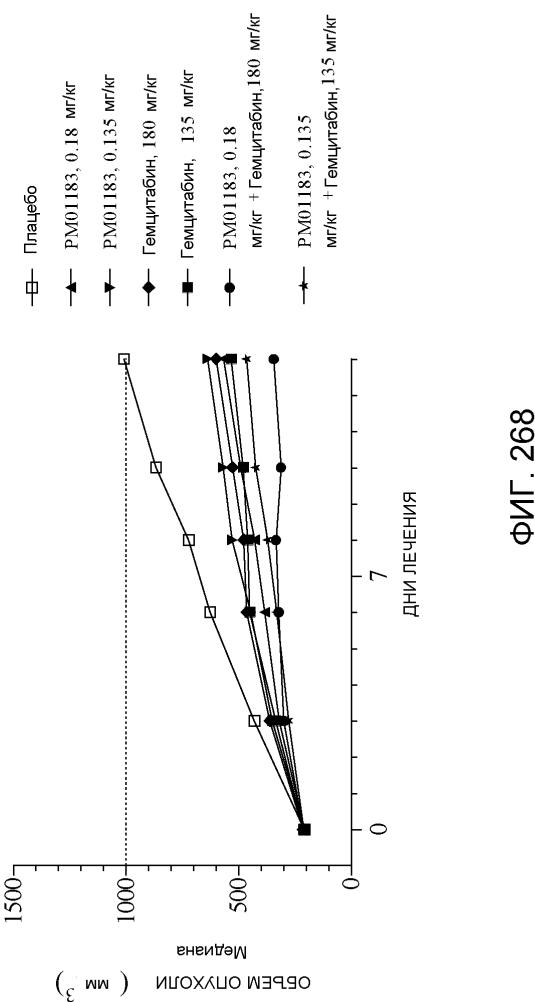


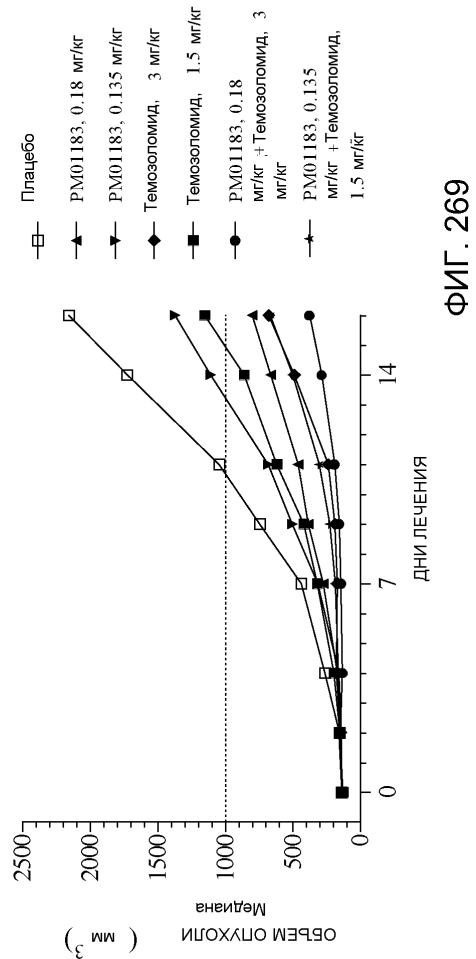


ФИГ. 266

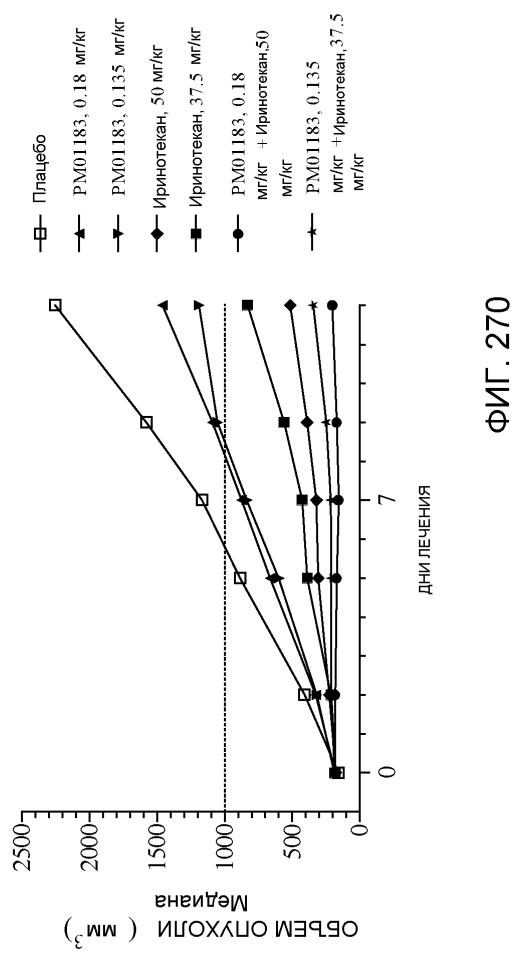


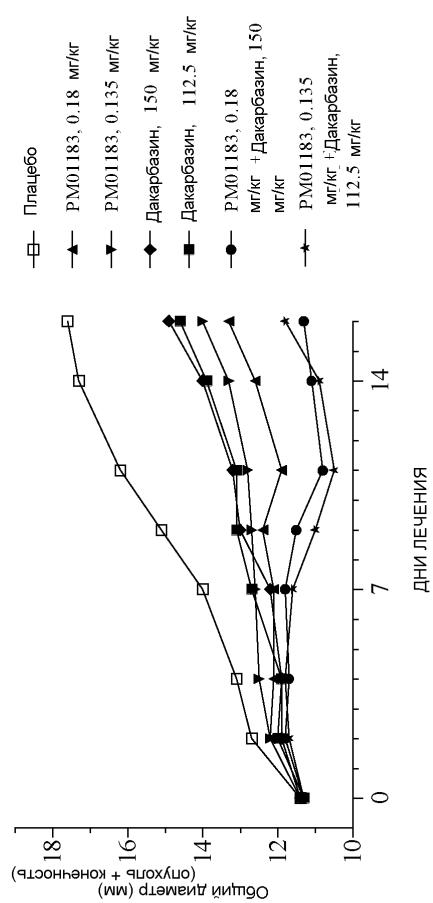
ФИГ. 267



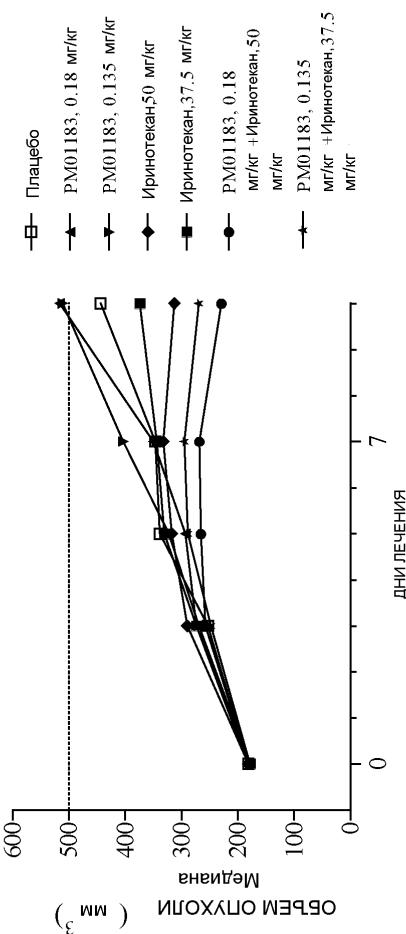


ФИГ. 269

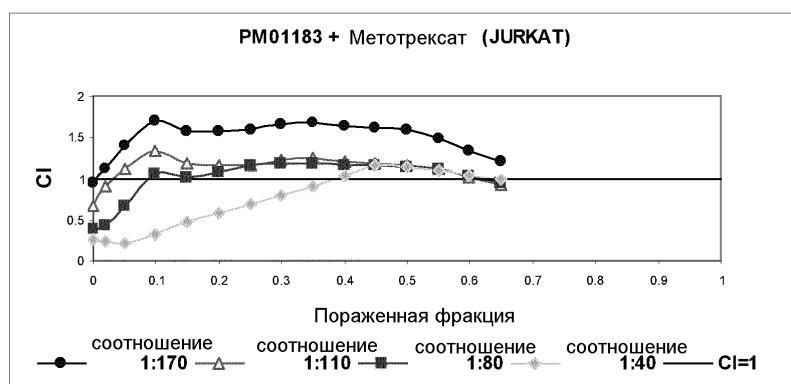




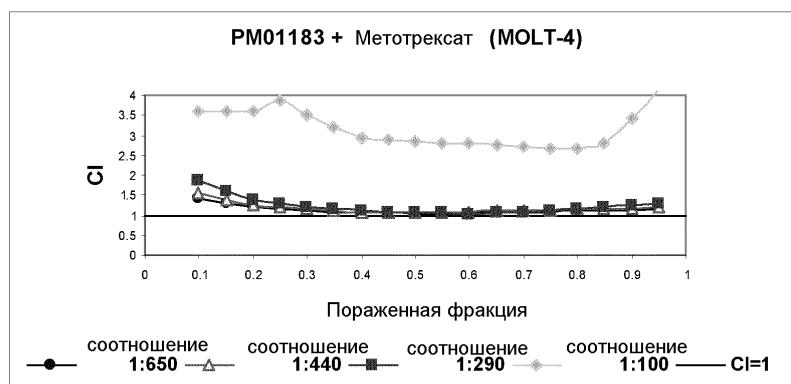
ФИГ. 271



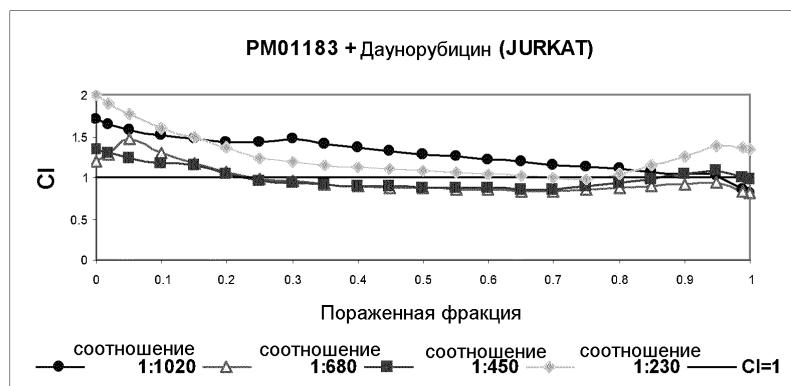
ФИГ. 272



ФИГ. 273

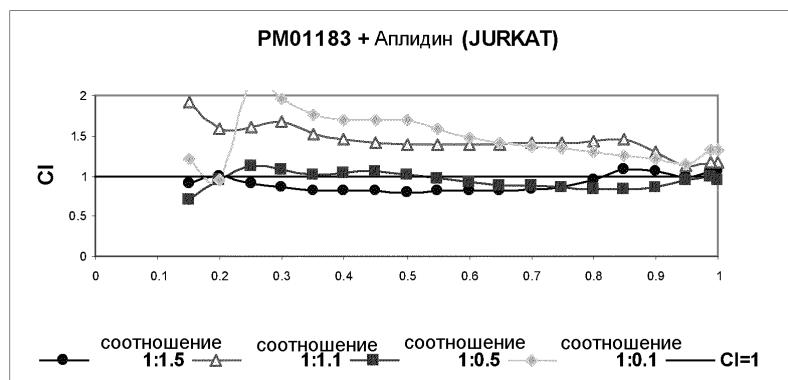


ФИГ. 274

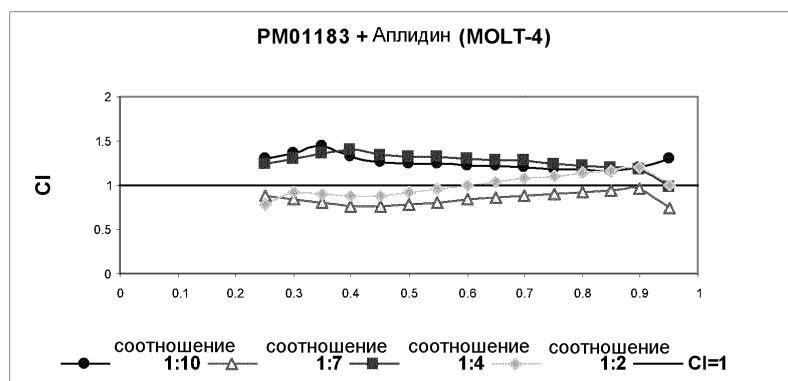


ФИГ. 275

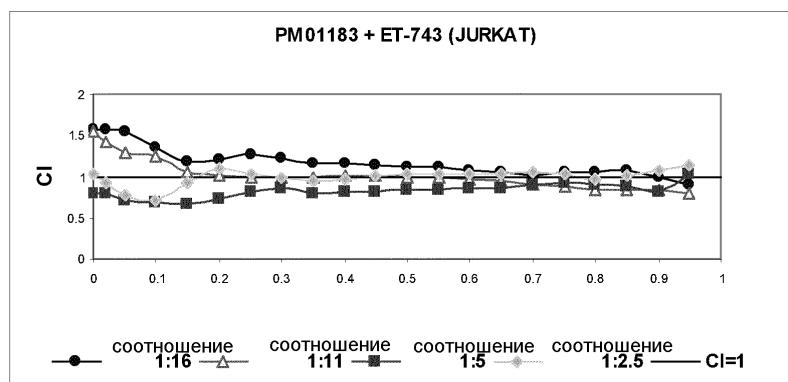
56/62



ФИГ. 276

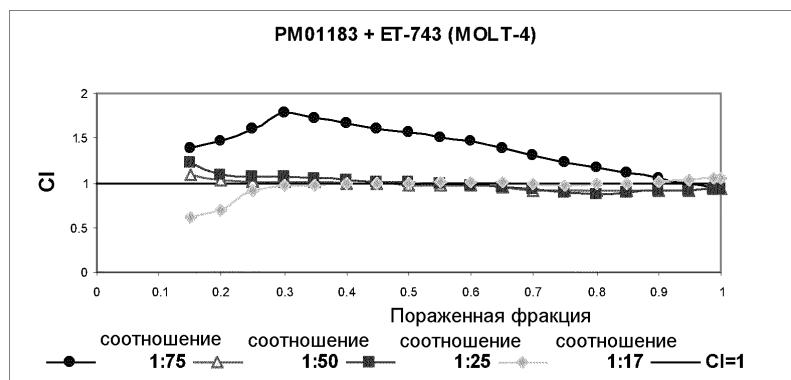


ФИГ. 277

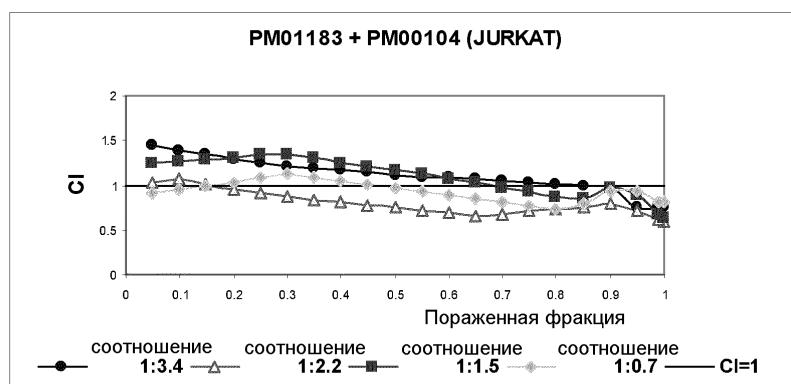


ФИГ. 278

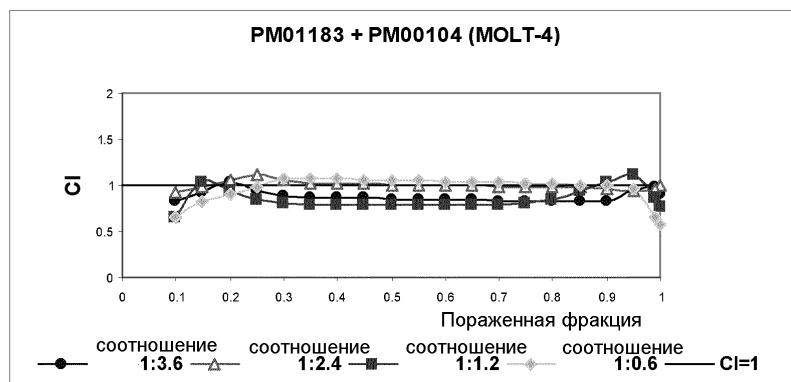
57/62



ФИГ. 279

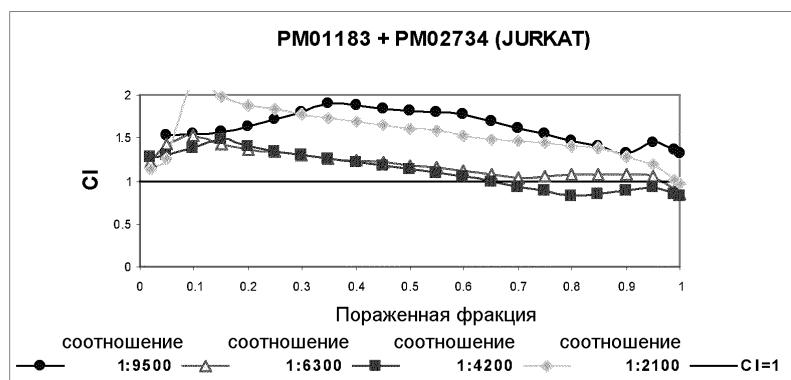


ФИГ. 280

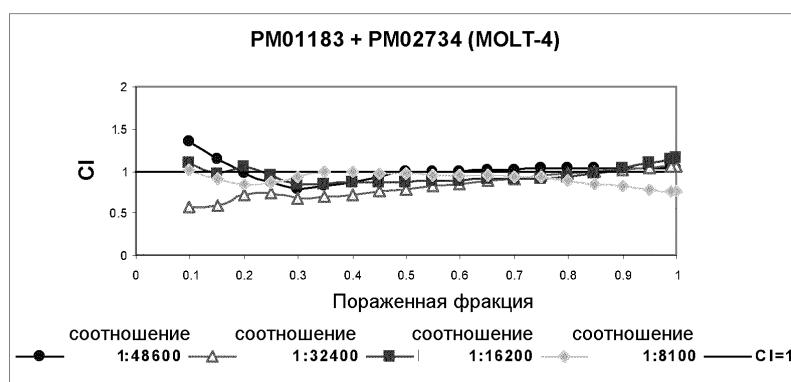


ФИГ. 281

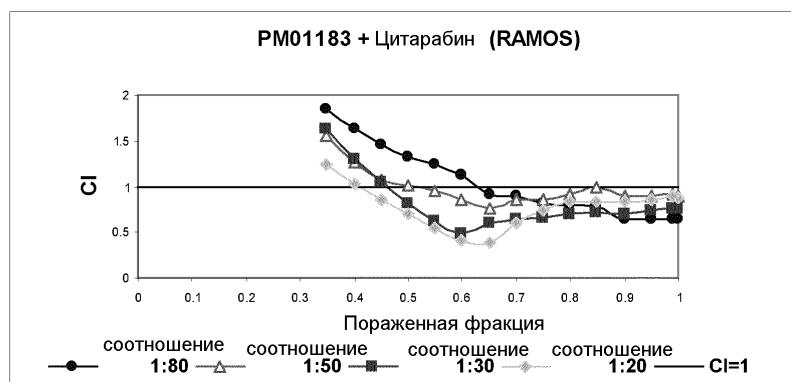
58/62



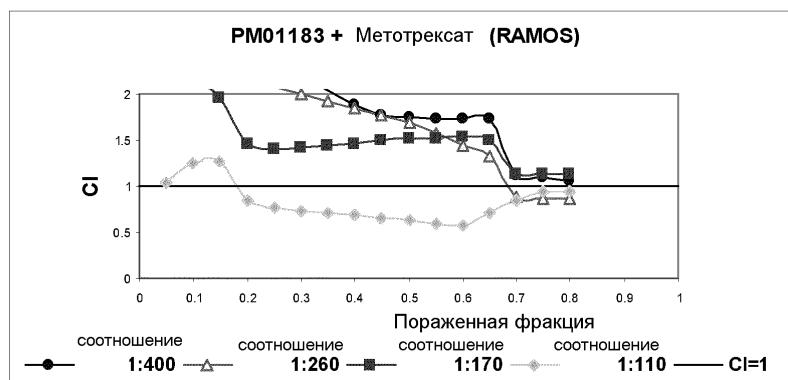
ФИГ. 282



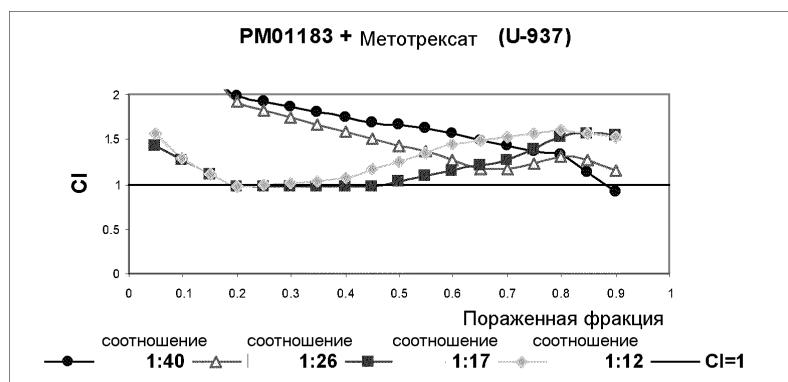
ФИГ. 283



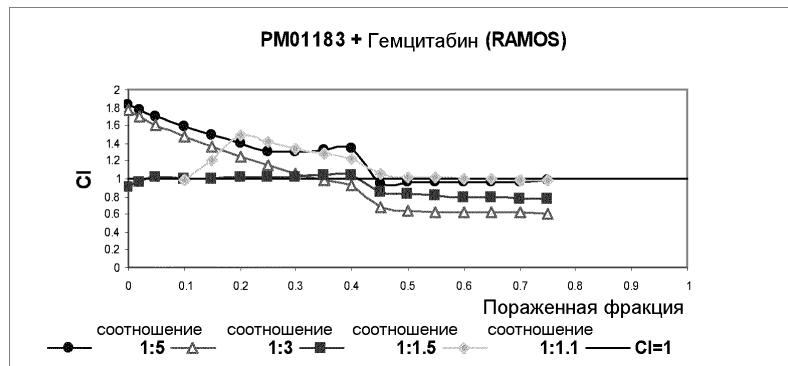
ФИГ. 284



ФИГ. 285

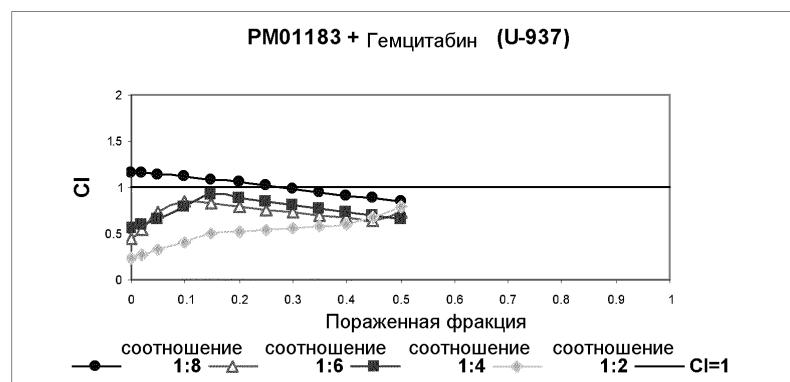


ФИГ. 286

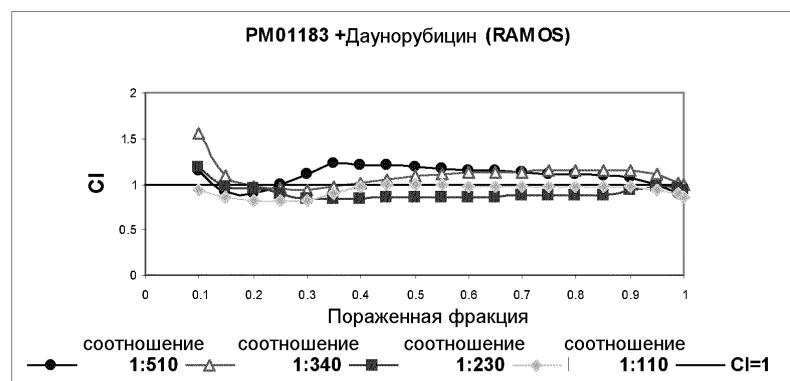


ФИГ. 287

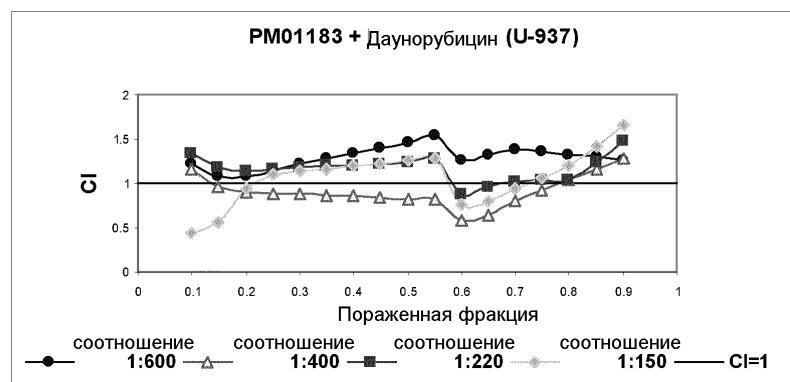
60/62



ФИГ. 288

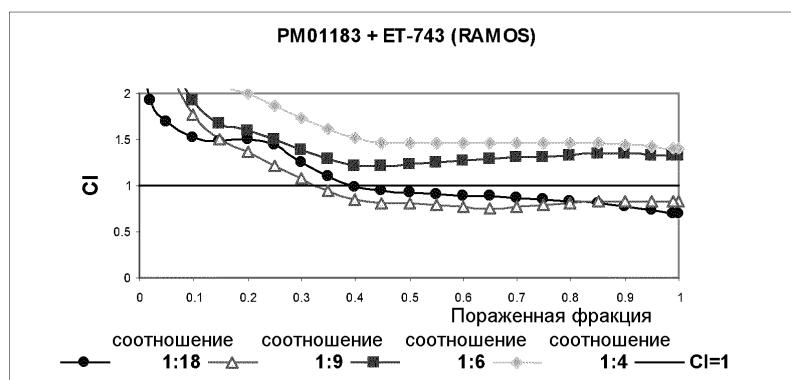


ФИГ. 289

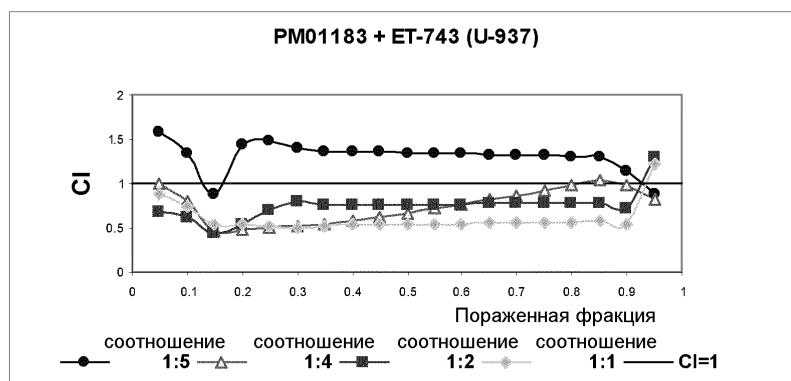


ФИГ. 290

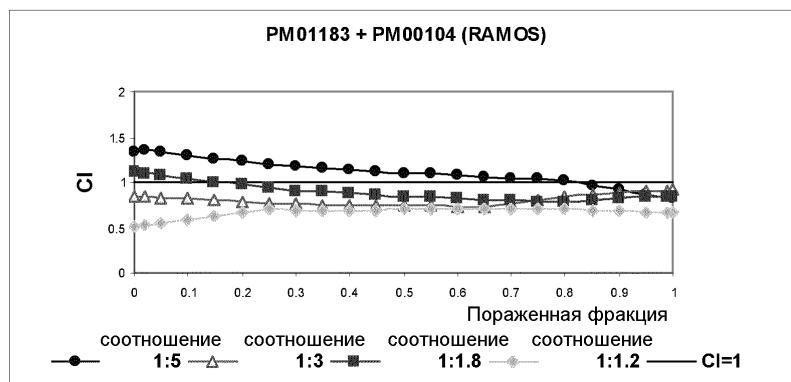
61/62



ФИГ. 291

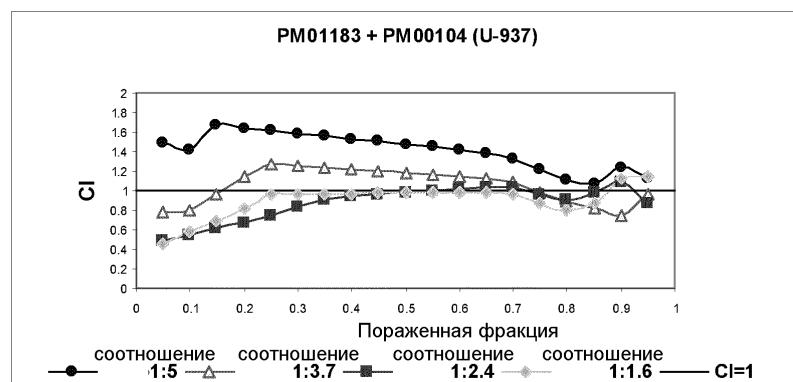


ФИГ. 292

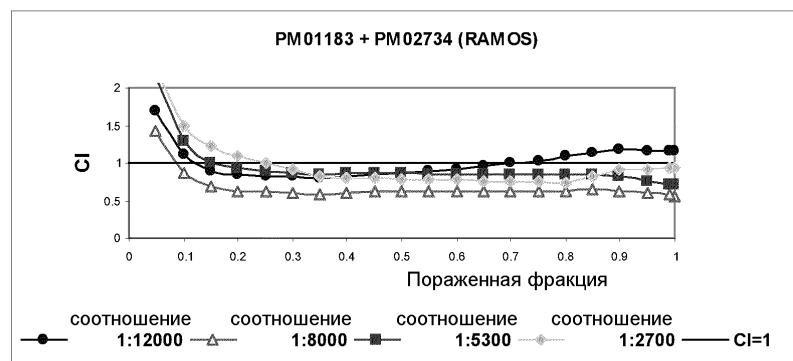


ФИГ. 293

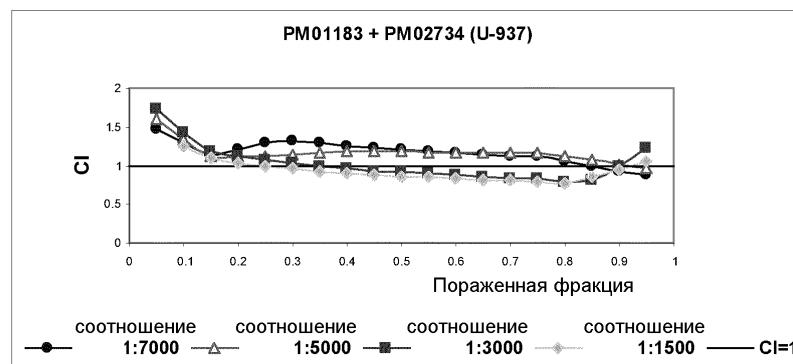
62/62



ФИГ. 294



ФИГ. 295



ФИГ. 296