



(51) МПК
A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/4015 (2020.01); *A61K 31/4025* (2020.01); *A61K 31/166* (2020.01); *A61P 35/00* (2020.01)

(21)(22) Заявка: 2017112048, 29.09.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.09.2015

Дата регистрации:
24.03.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
10.10.2014 US 62/062,192

(43) Дата публикации заявки: 15.11.2018 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 24.03.2020 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.05.2017

(86) Заявка РСТ:
IB 2015/057457 (29.09.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/055907 (14.04.2016)

Адрес для переписки:
107061, г. Москва, ул. Преображенская пл., д.
6, ООО "Вахнина и Партнеры"

(72) Автор(ы):

САПРА Пуджа (US),
ШОР Борис (US)

(73) Патентообладатель(и):
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2012/054748 A2, 26.04.2012.
D'AMATO V. et al. The dual PI3K/mTOR
inhibitor PKI-587 enhances sensitivity to
cetuximab in EGFR-resistant human head and
neck cancer models//Br J Cancer. 2014 Jun 10;
110(12): 2887-2895. Published online 2014 May 13.
doi: 10.1038/bjc.2014.241. HERZOG A. et al. PI3K/
mTOR inhibitor PF-04691502 antitumor activity
is (см. прод.)

(54) СИНЕРГИСТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ АУРИСТАНА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области фармацевтики и может быть использована при лечении рака. Способ лечения рака у субъекта включает совместное введение субъекту, нуждающемуся в этом, 2-метилаланил-*N*-(3*R*,4*S*,5*S*)-3-метокси-1-{(2*S*)-2-[*(1R*,*2R*)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-{[(1*S*)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]пирролидин-1-ил}-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-*N*-метил-*L*-валинамида или его фармацевтически приемлемой соли и

ингибитора PI3K-mTOR, выбранного из PF-384 и его фармацевтически приемлемых солей. Группа изобретений касается также фармацевтической композиции, дозированной формы и набора для лечения рака у млекопитающих. Группа изобретений обеспечивает синергетический эффект на клеточных линиях рака легких, рака молочной железы и рака яичников. 4 н. и 4 з.п. ф-лы, 8 ил., 5 табл., 11 пр.

R U 2 7 1 7 5 7 0 C 2

R U 2 7 1 7 5 7 0 C 2

(56) (продолжение):

enhanced with induction of wild-type TP53 in human xenograft and murine knockout models of head and neck cancer//Clin Cancer Res. 2013 Jul 15;19(14):3808-19. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2716. Epub 2013 May 2., реферат.
WATANABE K. et al. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway enhances the therapeutic efficacy of microtubule-destabilizing agents in human tumor xenograft models//Clin Cancer Res. 2010 Feb 15;16(4):1170-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2482. Epub 2010 Feb 9. WO 2008/141044 A2, 20.11.2008. WO 2013/072813 A2, 23.05.2013. WATSON AL. et al. Co-targeting the MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in two genetically engineered mouse models of schwann cell tumors reduces tumor grade and multiplicity//Oncotarget. 2014 Mar 30;5(6):1502-14., реферат.

R U 2 7 1 7 5 7 0 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 717 570⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/4015 (2020.01); *A61K 31/4025* (2020.01); *A61K 31/166* (2020.01); *A61P 35/00* (2020.01)

(21)(22) Application: 2017112048, 29.09.2015

(24) Effective date for property rights:
29.09.2015

Registration date:
24.03.2020

Priority:

(30) Convention priority:
10.10.2014 US 62/062,192

(43) Application published: 15.11.2018 Bull. № 32

(45) Date of publication: 24.03.2020 Bull. № 9

(85) Commencement of national phase: 10.05.2017

(86) PCT application:
IB 2015/057457 (29.09.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/055907 (14.04.2016)

Mail address:
107061, g. Moskva, ul. Preobrazhenskaya pl., d. 6,
OOO "Vakhnina i Partnery"

(72) Inventor(s):

SAPRA, Puja (US),
SHOR, Boris (US)

(73) Proprietor(s):

PFIZER INC. (US)

(54) SYNERGISTIC COMBINATIONS OF AURISTANE

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions can be used in treating cancer. Method of treating cancer in a subject involves combined administration to a subject in need thereof, 2-methylalanyl-N-[(3R,4S,5S)-3-methoxy-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]amino]propyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N-methyl-L-valineamide or its pharmaceutically acceptable salt

and a PI3K-mTOR inhibitor selected from PF-384 and pharmaceutically acceptable salts thereof. Group of inventions also refers to a pharmaceutical composition, a dosage form and a kit for treating cancer in mammals.

EFFECT: group of inventions provides a synergistic effect on cell lines of lung cancer, breast cancer and ovarian cancer.

8 cl, 8 dwg, 5 tbl, 11 ex

R U 2 7 1 7 5 7 0 C 2

Область изобретения

Данное изобретение касается комбинаций ауристатина или конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) на основе ауристатина со вторым активным агентом, таким как ингибитор PI3K/mTOR, ингибитор MEK, таксан, или другой противораковый агент. Изобретение также касается способов лечения аномального роста клеток, например рака, путем введения данных комбинаций пациентам.

Краткое описание изобретения

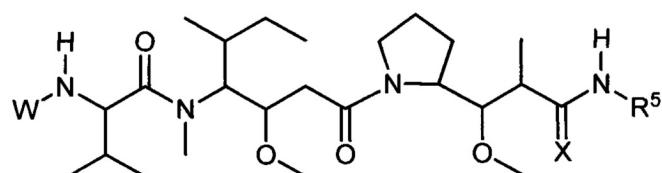
В одном варианте осуществления представленного изобретения предусматривается способ лечения аномального клеточного роста, такого как рак, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества комбинации ауристатина, или ADC на основе ауристатина, и второго агента, выбранного из ингибитора PI3K/mTOR, ингибитора MEK, таксана и других противораковых агентов.

Раковая мишень лекарственного препарата mTOR существует в двух типах комплексов: mTORC1 содержащий субъединицу «raptor» и mTORC2, содержащий «rictor». Как известно в данной области из уровня техники, "rictor" относится к регуляторному белку роста клеток, имеющему локус Sp13 гена человека. 1. Данные комплексы регулируются по-разному и имеют различный спектр субстратов. mTORC2, как правило, нечувствителен к рапамицину и селективным ингибиторам. mTORC2, как полагают, модулирует передачу сигналов фактора роста путем фосфорилирования C-терминального гидрофобного мотива некоторых AGC-киназ, таких как Akt. Во многих клеточных контекстах mTORC2 требуется для фосфорилирования сайта S473 Akt. Таким образом, активность mTORC1 частично контролируется Akt, тогда как сам Akt частично контролируется mTORC2. Стимуляция фактора роста фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) вызывает активацию Akt путем фосфорилирования в двух ключевых сайтах S473 и T308. Сообщалось, что полная активация Akt требует фосфорилирования, как S473, так и T308Active. Akt стимулирует выживание и пролиферацию клеток многими способами, включая подавление апоптоза, стимулирование поглощения глюкозы и изменение клеточного метаболизма. Из двух сайтов фосфорилирования при Akt считается, что активационное петлевое фосфорилирование на T308, опосредованное PDK1, является незаменимым для активности киназы, тогда как фосфорилирование гидрофобного мотива на S473 усиливает активность киназы Akt. Фосфорилирование AKT на S473 можно использовать в качестве маркера для конститутивной активации пути PI3K/AKT mTOR.

Другой вариант осуществления изобретения касается способа лечения рака у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатина и ингибитора PI3K-mTOR, где указанный ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502.

В одном предпочтительном варианте осуществления ингибитор PI3K-mTOR представляет собой PF-384.

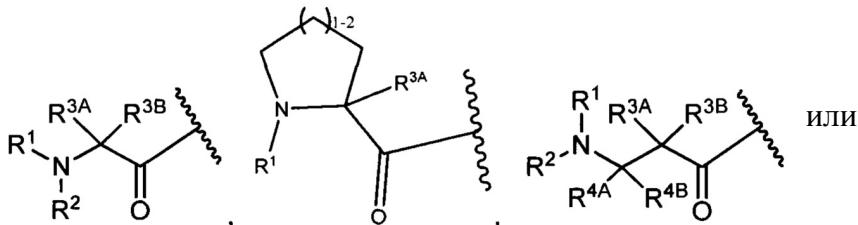
В другом варианте осуществления предусматривается способ лечения рака у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатина и ингибитора PI3K-mTOR, где ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502, и, где указанный ауристатин представляет собой соединение формулы:



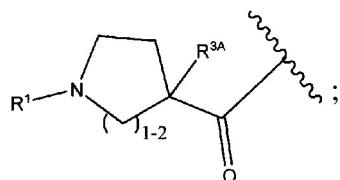
или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, или конъюгат антитело-лекарственное средство указанного соединения, или соли, или сольвата, где независимо для каждого случая,

5

W представляет собой



10



15

R¹ представляет собой водород, C₁-C₈ алкил или C₁-C₈ галогеналкил;

R² представляет собой водород, C₁-C₈ алкил или C₁-C₈ галогеналкил;

R^{3A} и R^{3B} представляет один из следующих:

20

(i) R^{3A} представляет собой водород, C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил, галоген или арилалкил; и R^{3B} представляет собой C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил, арилалкил или галоген; или

25

(ii) R^{3A} и R^{3B}, взятые вместе, представляют собой C₂-C₈ алкилен или C₁-C₈ гетероалкилен;

R^{4A} и R^{4B} представляет один из следующих:

30

(i) R^{4A} представляет собой водород, C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил или арилалкил; и

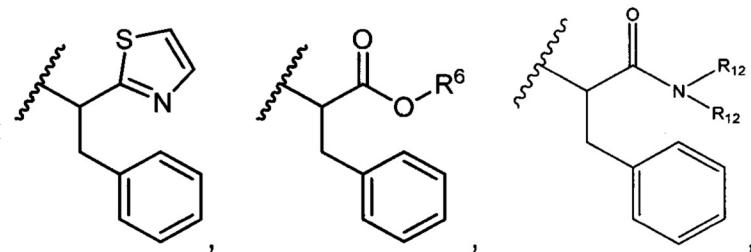
R^{4B} представляет собой водород, C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил или арилалкил; или

35

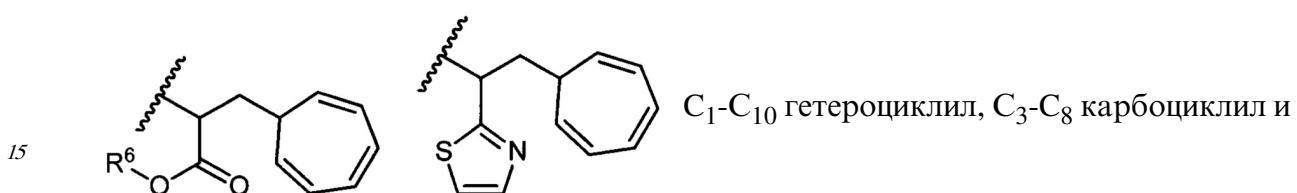
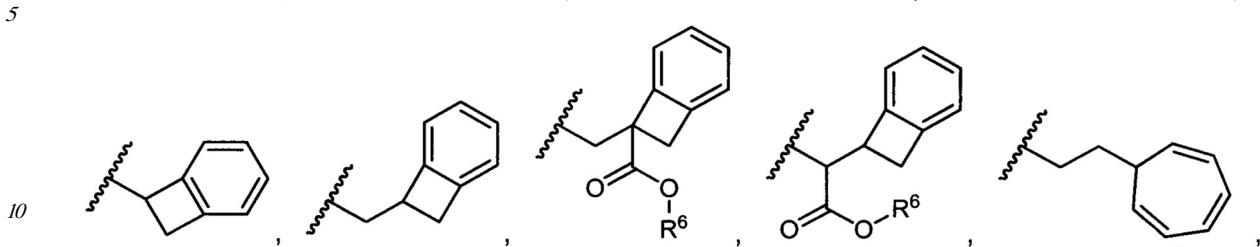
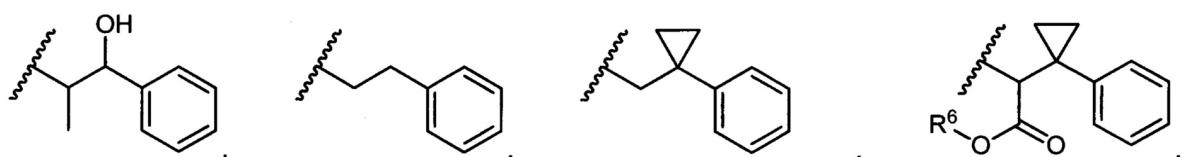
(ii) R^{4A} и R^{4B} взятые вместе представляют собой C₂-C₈ алкилен или C₁-C₈ гетероалкилен;

40

R⁵ представляет собой



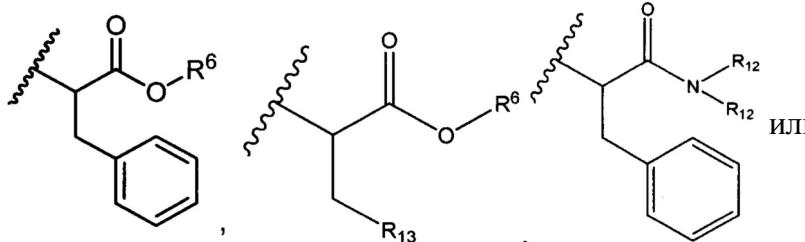
45



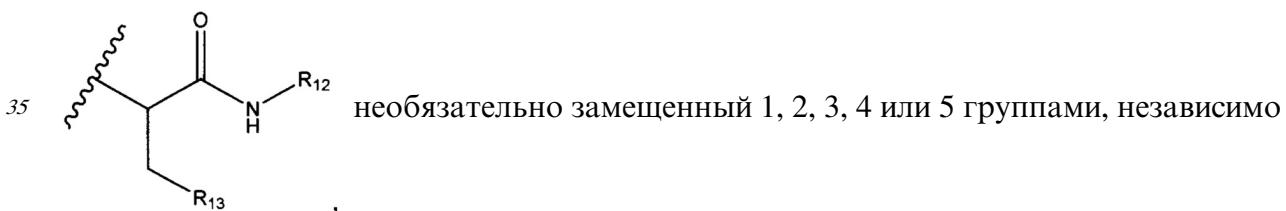
C₆-C₁₄ арил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 группами, независимо
выбранными из группы, состоящей из -C₁-C₈ алкила, -C₁-C₈ алкил-N(R')₂, -C₁-C₈ алкил-
C(O)R', -C₁-C₈ алкил-C(O)OR'-O-(C₁-C₈ алкила), -C(O)R', -OC(O)R'-C(O)OR', -C(O)N(R')₂,
-NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, галогена, -N₃, -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂,
-S(=O)₂R' и -SR', где каждый R' является независимо выбранным из группы, состоящей
из водорода, C₁-C₈ алкила и незамещенного арила, или два R' могут вместе с азотом,
к которому они присоединены, образовывать C₁-C₁₀ гетероциклик;

25

или R⁵ представляет собой



30



выбранными из группы, состоящей из C₁-C₈ алкила, -C₁-C₈ алкил-N(R')₂, -C₁-C₈ алкил-
C(O)R', -C₁-C₈ алкил-C(O)OR', -O-(C₁-C₈ алкила), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)N
(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, галоген, -N₃, -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂,
-NHCONH₂, -S(=O)₂R', -SR' и арилен-R', где каждый R' является независимо выбранным
из группы, состоящей из водорода, C₁-C₈ алкила, C₁-C₈ гетероциклила,
C₁-C₁₀ алкилен-C₃-C₈ гетероциклила и арила, или два R' могут вместе с азотом, к
которому они присоединены, образовывать C₁-C₁₀ гетероциклик;

40

45

R⁶ представляет собой водород, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил или

-C₁-C₈ галогеналкил;

R¹² представляет собой водород, C₁-C₄ алкил, C₁-C₁₀ гетероциклик или C₆-C₁₄ арил;

R¹³ представляет собой C₁-C₁₀ гетероциклик; и

⁵ X представляет собой О.

В следующем варианте осуществления такого способа, ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502, и ауристатин выбирают из конъюгата антитело-лекарственное средство 5T4-ADC, PF-101 и MMAF.

¹⁰ В следующем варианте осуществления такого способа, ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502, и ауристатин представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство 5T4-ADC

В следующем варианте осуществления такого способа, ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502, и ауристатин представляет собой ауристатин-101

¹⁵ В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502, и ауристатин представляет собой MMAF.

В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор PI3K-mTOR и ауристатин, или ADC на основе ауристатина, используется для лечения рака легких.

В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор PI3K-mTOR и ауристатин, или ADC на основе ауристатина, используется для лечения рака молочной ²⁰ железы.

В следующем варианте осуществления такого способа, ауристатин, или ADC на основе ауристатина, и ингибитор PI3K-mTOR вводятся одновременно или вводятся поочередно.

²⁵ В следующем варианте осуществления такого способа, ауристатин или ADC на основе ауристатина и ингибитор PI3K-mTOR вводятся последовательно в каком-либо порядке.

В другом варианте осуществления изобретение касается фармацевтической композиции, которая включает: количество ауристатина или его фармацевтически приемлемой соли; количество PF-384 или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

³⁰ Другой вариант осуществления изобретения касается способа лечения рака у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатина и ингибитора MEK.

В одном предпочтительном варианте осуществления MEK ингибитор представляет собой PD-901.

³⁵ В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор MEK представляет собой PD-901, и ауристатин выбирают из конъюгата антитело-лекарственное средство 5T4-ADC, PF-101 и MMAF.

В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор MEK представляет собой PD-901, и ауристатин представляет собой конъюгат антитело-лекарственное ⁴⁰ средство 5T4-ADC

В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор MEK представляет собой PD-901, и ауристатин представляет собой ауристатин-101

В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор MEK представляет собой PD-901, и ауристатин представляет собой MMAF.

⁴⁵ В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор MEK и ауристатин, или ADC на основе ауристатина, используется для лечения рака легких.

В следующем варианте осуществления такого способа ингибитор MEK и ауристатин, или ADC на основе ауристатина, используется для лечения рака молочной железы.

Еще один вариант осуществления изобретения касается фармацевтической композиции, которая включает: количество ауристатина, или ADC на основе ауристатина, или его фармацевтически приемлемой соли, и количество PD-901 или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или

5 разбавитель.

Другой вариант осуществления изобретения касается способа лечения рак у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатина и таксана.

В следующем варианте осуществления такого способа таксан представляет собой

10 паклитаксел или доцетаксел, и ауристатин выбирают из конъюгата антитело-лекарственное средство 5T4-ADC, PF-101 и MMAF.

В следующем варианте осуществления такого способа таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел, и ауристатин представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство 5T4-ADC.

15 В следующем варианте осуществления такого способа таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел, и ауристатин представляет собой ауристатин-101.

В следующем варианте осуществления такого способа таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел, и ауристатин представляет собой MMAF.

20 В следующем варианте осуществления такого способа таксан и ауристатин, или ADC на основе ауристатина, используется для лечения рака легких. В следующем варианте осуществления такого способа таксан и ауристатин, или ADC на основе ауристатина, используется для лечения рака молочной железы.

25 Еще один вариант осуществления изобретения касается фармацевтической композиции, которая включает: количество ауристатина, или ADC на основе ауристатина, или его фармацевтически приемлемой соли, и количество таксана, выбранного из паклитаксела и доцетаксела, или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

30 Кроме того, представленными являются варианты осуществления, в которых ауристатин и указанный таксан вводятся одновременно или вводятся поочередно.

35 Кроме того, представленными являются варианты осуществления, в которых ауристатин и указанный таксан вводятся последовательно в каком-либо порядке.

Следующий вариант осуществления включает фармацевтическую композицию, которая включает: количество ауристатина, или его фармацевтически приемлемой соли; количество таксана, или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

40 Предусматривается вариант осуществления, в котором, в каком либо из способов одновременного введения, описанном в данном документе, который включает введение ауристатина с ингибитором PI3K/mTOR, ауристатина с ингибитором MEK, и ауристатина с таксаном, противораковый эффект, достигаемый за счет одновременного введения, является большим, чем противораковые эффекты, достигаемые с использованием указанной первой и второй фармацевтических композиций, вводимых не одновременно.

45 Для лечения рака у млекопитающего предусматриваются варианты осуществления дозированной формы, которая включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемой соли; (б) ингибитор PI3K-mTOR, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Для лечения рака у млекопитающего предусматриваются варианты осуществления дозированной формы, которая включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически

приемлемую соль; (b) ингибитор MEK, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный MEK ингибитор представляет собой PD-901; и (c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Для лечения рака у млекопитающего предусматриваются варианты осуществления 5 дозированной формы, которая включает: (a) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный ауристатин представляет собой ауристатин-101; (b) таксан, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел; и (c) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

10 Предусмотренными являются варианты осуществления набора, который включает: (a) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме; (b) ингибитор PI3K-mTOR, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при 15 этом указанный ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502; и (c) средство для содержания указанной первой и второй дозированных форм.

Предусмотренными являются варианты осуществления набора, который включает: (a) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме; (b) 20 ингибитор MEK, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при этом указанный MEK ингибитор представляет собой PD-901; и (c) средство для содержания указанных первой и второй дозированных форм.

Предусмотренными являются варианты осуществления набора, который включает: 25 (a) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при этом указанный ауристатин представляет собой ауристатин-101; (b) таксан, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при этом указанный таксан 30 представляет собой паклитаксел или доцетаксел; и (c) средство для содержания указанной первой и второй дозированных форм.

Краткое описание чертежей

ФИГ. 1: Обобщение значений комбинационных индексов (CI) в панеле раковых клеточных линий. А. Точечная диаграмма, показывающая диапазон значений индекса 35 CI, полученный после анализа комбинаций лекарственных средств с PF-384, двойным ингибитором PI3K/mTOR или со mTOR-специфическим ингибитором. В. Точечная диаграмма, показывающая диапазон значений индекса CI, полученный после анализа комбинаций лекарственных средств с PTX. Индексы CI для А. и В. определяли с использованием метода Чоу-Талалая, как описано в Материалах и Способах, и 40 представляли в виде уровня ED50 для каждой из комбинаций. Результаты представляют собой среднее значение от, по меньшей мере, троих независимых экспериментов. Значение CI интерпретировалось следующим образом: очень сильный синергизм (<0,1), сильный синергизм (от 0,1 до 0,3), синергизм (от 0,3 до 0,7), умеренный синергизм (от 0,7 до 0,85), незначительный синергизм (от 0,85 до 0,9), почти аддитивный (от 0,9 до 45 1,1), незначительный антагонизм (от 1,1 до 1,2) и умеренный антагонизм (от 1,2 до 1,45). Пунктирные линии имеют значения CI 1,1 и 0,7. PTX, паклитаксел; VINO, винорелбин; Aur101, ауристатин-101; mTORi, WYE-132.

ФИГ. 2: Динамический мониторинг клеточного роста на клетках MDA-468 с

использованием системы xCELigence System. А. Зависящие от концентрации и времени цитотоксические эффекты от 5T4-ADC, PF-384 или комбинации в клетках MDA-468. В А. показан один представитель из трех разных экспериментов. В. Значения индекса импеданса представлены для 8-часовой временной точки и показывают статистически значимое усиление ингибиования клеточного роста для комбинации 5T4-ADC плюс PF-384. С. Зависящие от концентрации и времени цитотоксические эффекты от MMAF-OMe, PF-384 или комбинации в клетках MDA-468. В С. показан один представитель из трех разных экспериментов. Д. Значения индекса импеданса представлены для 8-часовой временной точки и показывают статистически значимое усиление ингибиования клеточного роста для комбинации MMAF-OMe плюс PF-384.

ФИГ. 3: Комбинация 5T4-ADC или MMAF-OMe с PF-384 или PTX приводит к более сильному подавлению клеточного роста в 3D культуре. MDA-468 (А-Ф) или Н-1975 (Г-Д) клетки, выращенные в виде 3D-сфераидов в матригеле, и жизнеспособность сфераид измеряли, как описано в Материалах и Способах. Значения представляют собой средние значения \pm SEM. А, MDA-468 клетки обрабатывали увеличивающимися дозами 5T4-ADC, фиксированной дозой PF-384 (10 нМ) или комбинацией обоих лекарственных средств в течение 7 дней. Построенный график представляет собой процент от роста по отношению к соответствующему необработанному контролю. Пунктирная линия указывает % жизнеспособности для фиксированной дозы PF-384. В. Графики гистограммы выбранных точек данных при указанных концентрациях лекарственного средства из А. Звездочки представляют собой значительные отличия от 5T4-ADC+PF-384 (**p<0,01, t-критерий Стьюдента). С, MDA-468 клетки обрабатывали увеличивающимися дозами PF-384, фиксированной дозой MMAF-OMe (0,8 нМ) или комбинацией обоих лекарственных средств в течение 7 дней. Построенный график представляет собой процент от роста по отношению к соответствующему необработанному контролю. Пунктирная линия указывает % жизнеспособности для фиксированной дозы MMAF-OMe. Д. Графики гистограммы выбранных точек данных при указанных концентрациях лекарственного средства из (С). Звездочки представляют собой значительные отличия от MMAF-OMe+PF-384 (**p<0,01, ***p<0,001; t-критерий Стьюдента). Е. MDA-468 клетки обрабатывали увеличивающимися дозами 5T4-ADC, фиксированной дозой PTX (1 нМ) или комбинацией обоих лекарственных средств в течение 7 дней. Построенный график представляет собой процент от роста по отношению к соответствующему необработанному контролю. Пунктирная линия указывает % жизнеспособности для фиксированной дозы PTX. Ф. Графики гистограммы выбранных точек данных при указанных концентрациях лекарственного средства из (Е). Значения представляют собой средние значения \pm SEM. Звездочки представляют собой значительные отличия от 5T4-ADC+PTX (**p<0,01, ***p<0,001; t-критерий Стьюдента). Г. Кривая зависимости ответа от дозы Н-1975 сфераидов, обработанных увеличивающейся концентрацией PF-384, фиксированными дозами 5T4-ADC (5 или 10 мкг/мл), или комбинацией из двух лекарственных средств. Н. Графики гистограммы выбранных точек данных при указанных концентрациях лекарственного средства из Г. Звездочки представляют собой значительные отличия от 5T4-ADC (10 мкг/мл)+PF-384 (*p<0,05, ***p<0,001; t-критерий Стьюдента) или от 5T4-ADC (5 мкг/мл)+PF-384 (*p<0,05; t-критерий Стьюдента) комбинаций. И. Кривая зависимости ответа от дозы Н-1975 сфераидов, обработанных увеличивающейся концентрацией PF-384, фиксированными дозами MMAF-OMe (0,3 или 0,8 нМ), или комбинацией из двух лекарственных средств. Ј. Графики гистограммы выбранных точек данных при указанных концентрациях лекарственного средства из И. Звездочки представляют собой

значительные отличия от MMAF-OMe (0,3 нМ)+PF-384 (* $p<0,05$; t-критерий Стьюдента) или от MMAF-OMe (0,8 нМ+PF-384 (** $p<0,01$, **** $p<0,0001$, t-критерий Стьюдента) комбинаций.

ФИГ. 4: Индуцирование активности каспазы 3/7 с использованием комбинации 5T4-

- 5 ADC или MMAF-OMe с PF-384 или РТХ. А, Д Повышенное индуцирование каспазы 3/7 в MDA-468 (А) или Н-1975 (Е) клетках, обработанных 5T4-ADC (10 мкг/мл) плюс PF-384 (1 мкМ) в течение 24 часов. В, F Повышенное индуцирование каспазы 3/7 в MDA-468 (В) или Н-1975 (F) клетках, обработанных MMAF-OMe (2 нМ) плюс PF-384 (1 мкМ) в течение 24 часов. С, D Повышенное индуцирование активности каспазы 3/7 в MDA-468 клетках, обработанных 5T4-ADC (1 мкг/мл) плюс РТХ (6 нМ) (С) или MMAF-OMe (0,22 нМ) плюс РТХ (6 нМ) (D) в течение 48 часов. Индуцирование кратности в активности каспазы 3/7 определяли, как описано в Материалах и Способах. Показаны средние значения и SEM экспериментов в трех повторениях. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Звездочки показывают статистически значимые различия между каждым из одиночных лекарственных средств по отдельности и комбинацией; t-критерий Стьюдента.

ФИГ. 5: Влияние обработки одного агента 5T4ADC, MMAF-OMe, PF-384 и их

комбинаций на профили клеточного цикла. Распределение MDA-468, обработанных носителем (Cntrl), 5T4-ADC (1 мкг/мл), PF-384 (100 нМ) в качестве единственных агентов

- 20 или комбинацией 5T4-ADC (1 мкг/мл) плюс PF-384 (100 нМ) по стадиям клеточного цикла в течение 24 (А) и 36 (В) часов. С. Влияние обработки одним агентом 5T4-ADC, PF-384 и их комбинацией на митотический индекс. Митотический индекс определяли с помощью проточной цитометрии в процентах от фосфорно-гистоновых Н3- положительных клеток в популяции для эксперимента, показанного в А, В. Анализ 25 клеточного цикла и митотический индекс выполняли с использованием проточной цитометрии с помощью набора FlowCollect Bivariate Cell Cycle. Фазы G1, S, G2 клеточных циклов были построены как средний процент от общей популяции клеток со стандартной ошибкой. Результаты представлены двумя независимыми экспериментами, выполняемыми в трех повторениях планками погрешностей, представляющими 30 стандартную ошибку.

ФИГ. 6: Обработка комбинацией 5T4-ADC плюс PF-384 приводит к повышенному терапевтическому эффекту в моделях рака молочной железы и легких *in vivo*. А. Мышей, несущих подкожные опухоли MDA-468, обрабатывали носителем, 5T4-ADC (в.в. 2 мг/кг, Q4D × 4), PF-384 (в.в. 7,5 мг/кг, Q4D × 4) или комбинацией. Время до конечной точки

- 35 (TTE) определяется как время, которое прошло для животного для того, чтобы достичь регрессию опухоли. Графики Каплана-Мейера показывают изменение в процентах у животных с опухолями в течение времени. Анализ TTE демонстрирует значительно повышенную скорость регрессии опухоли с комбинацией при использовании комбинации 5T4-ADC и PF-384 по сравнению с активностью одного агента 5T4-ADC ($p<0,0001$, 40 логарифмический ранговый критерий Мантелля-Кокса). PF-384 не вызывал регрессий в данном эксперименте. В. Данные анализа индивидуального объема опухоли на 53-й день показаны в (А). 5T4-ADC плюс PF-384 приводит к статистически значимому ингибированию среднего объема опухоли по сравнению с обработками 5T4-ADC ($P<0,05$) или PF-384 ($P<0,0001$) по отдельности. Графики показывают индивидуальные 45 объемы опухолей на 53-й день (время, когда $\geq 15\%$ мышей были сняты с исследования в какой-либо из экспериментальных групп), колонки указывают средний объем опухоли на группу. СР, полные ремиссии определяются полной регрессией опухолей. С. Мышей, несущих подкожные опухоли Н-1975, обрабатывали 5T4-ADC (в.в. 3 мг/кг, Q4D × 4),

PF-384 (в.в. 7,5 мг/кг, Q4D × 4) или комбинацией. Конечная точка определяется как время, в течение которого объем опухоли утроился. Графики Каплана-Мейера показывают процент у животных с менее чем 3-кратным увеличением объема опухоли с течением времени. Анализ данных по ТТЕ демонстрирует значительную задержку

5 при показателе утраивания опухоли для комбинации 5T4-ADC плюс PF-384 по сравнению с активностью одного агента 5T4-ADC ($p=0,0356$, логарифмический ранговый критерий) или PF-384 ($p<0,0001$ логарифмический ранговый критерий) самостоятельно. Д. Данные анализа индивидуального объема опухоли на 21-й день, показанные в (С). 5T4-ADC приводит к статистически значимому ингибиованию среднего объема опухоли по

10 сравнению с лечением 5T4-ADC ($P<0,01$) или PF-384 ($P<0,0001$) по отдельности.

ФИГ. 7: Лечение комбинацией 5T4 ADC и PTX приводит к повышенному терапевтическому эффекту в моделях рака молочной железы и легких *in vivo*. А. Мышей, несущих подкожные опухоли MDA-468 обрабатывали 5T4-ADC (в.в. 2 мг/кг, Q4D × 4), PTX (п.о. 10 мг/кг, Q4D × 4) или комбинацией. Анализ данных по ТТЕ демонстрирует

15 значительно более высокую скорость полных регрессий опухолей, которые достигались при использовании комбинаций 5T4-ADC и PTX по сравнению с активностью одного агента 5T4-ADC ($p=0,0071$, логарифмический ранговый критерий) или PTX ($p=0,01$, логарифмический ранговый критерий). В. Данные анализа индивидуального объема опухоли на 53-й день показаны в (А). 5T4-ADC плюс PTX (10 мг/кг) приводит к

20 значительно повышенному ингибиованию среднего объема опухоли по сравнению с лечением 5T4-ADC ($P<0,05$) или PTX ($P<0,001$) по отдельности. Столбцы указывают средний объем опухоли на группу. СР, полные ремиссии определяются полной регрессией опухолей. С. Аналогично (А), но PTX использовали в дозе 22,5 мг/кг (п.о. Q4D × 4). Анализ данных ТТЕ показывает значительно более высокую скорость полных

25 регрессий опухолей, которые достигались при использовании комбинаций 5T4-ADC плюс PTX по сравнению с активностью одного агента 5T4-ADC ($p=0,00821$, логарифмический ранговый критерий) или PTX, который не вызывал регрессий опухоли при данной дозе. Д. Данные анализа индивидуального объема опухоли на 53-й день, показанных в (С). 5T4-ADC плюс PTX (22,5 мг/кг) приводит к повышенное

30 ингибиованию среднего объема опухоли по сравнению с лечением 5T4-ADC ($P<0,05$) или PTX ($p=0,07$) по отдельности. Столбцы указывают средний объем опухоли на группу. СР, полные ремиссии определяются полной регрессией опухолей. Е. Мышей, несущих подкожные опухоли H-1975 обрабатывали 5T4-ADC (в.в. 3 мг/кг, Q4D × 4), PTX (п.о. 10 мг/кг, Q4D × 4) или комбинацией. 5T4 ADC в сочетании с PTX является

35 более эффективным, чем лечение с использованием отдельных агентов. Анализ данных ТТЕ выполненный аналогично Фиг. 3С, демонстрирует значительную задержку при показателе утраивания опухоли для комбинации 5T4-ADC плюс PTX по сравнению с активностью одного агента 5T4-ADC ($p<0,0001$, логарифмический ранговый критерий) или PTX ($p=0,0001$ логарифмический ранговый критерий) по отдельности. Ф. Данные

40 анализа индивидуального объема опухоли на 46-й день, показанные в (Е). 5T4-ADC плюс PTX (22,5 мг/кг) приводит к повышенному ингибиованию среднего объема опухоли по сравнению с лечением 5T4-ADC ($p<0,0001$) или PTX ($p<0,0001$) по отдельности. Столбцы указывают средний объем опухоли на группу. Г. Мышей, несущих подкожные опухоли 37622A1 рака легких PDX обрабатывали 5T4-ADC (в.в. 3 мг/кг, Q4D × 4), PTX (п.о. 22,5 мг/кг, Q4D × 4) или комбинацией. Планки погрешностей

45 представляют стандартную ошибку среднего значения. Исследование прекратилось на 56-й день, когда одна из групп (носитель) потеряла больше, чем 15% животных. Статистический анализ, проведенный при окончании группы носителя ($***p<0,001$,

**** $p < 0,0001$, двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

ФИГ. 8: Лечение комбинацией 5T4-ADC плюс гемцитабин приводит к повышенному терапевтическому эффекту в моделях рака легких *in vivo*.

Мышей, несущих подкожные ксенотрансплантаты опухолей легких человека Н-1975

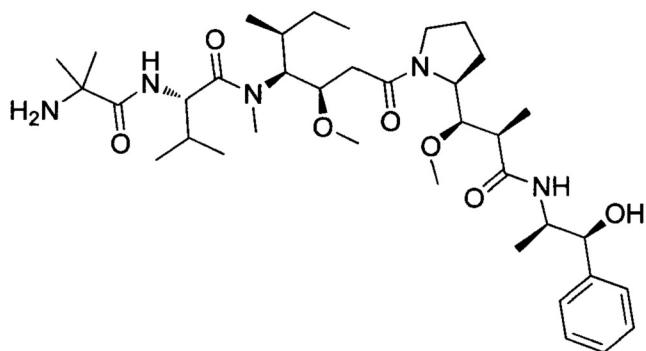
5 обрабатывали 5T4-ADC (в.в. 4 мг/кг, Q4D × 4), гемцитабином (в.в. 30 мг/кг, Q7D × 3) или комбинацией. На графике показаны кривые роста опухоли с объемами опухолей, который определяли в указанное время после начала лечения. Точки, средние значения от 10 мышей/группа; столбцы, SE.

Подробное описание изобретения

10 В представленном изобретении следующие термины описываются, как показано ниже, если не указано иное.

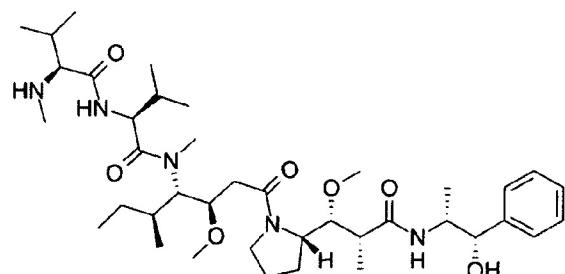
Ауристатины: Как используется в данном документе, термин "ауристатин" или "ауристатины" касается класса соединений на основе полипептидов, в том числе лекарственных средств, полученных из природных продуктов *Dolabella auricularia*, и 15 структурно родственных соединений, таких как ауристатин-101, MMAE и MMAF. Как используется в данном документе для описания компонента комбинации или комбинаций согласно изобретению, "ауристатин" или "ауристатины" также касается биологически конъюгированных молекул, которые включают или содержат ауристатин, например, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором биологический фрагмент, 20 такой как антитело (Ab), связан с полипептидным фрагментом. Типичные молекулы на основе полипептида ауристатина включают ауристатин-101, MMAE, и MMAF. Типичные ADC ауристатина включают 5T4-ADC.

"Ауристатин-101" касается полипептидному соединению ауристатина: 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3- оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]пирролидин-1-ил}-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамид, формулы:



или его фармацевтически приемлемой соли или сольватата, или производных.

"ММАЕ" касается полипептидного соединения ауристатина, известного как монометилауристатин Е, и имеющего формулу:



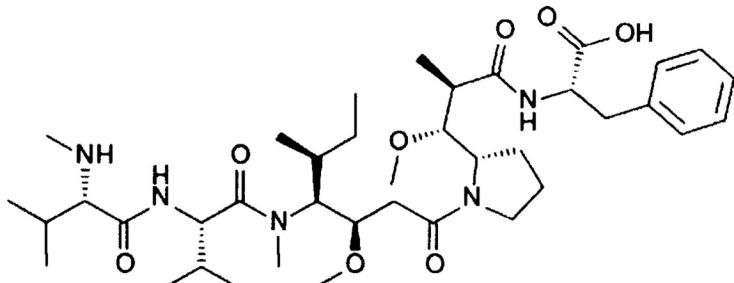
или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, или производных.

"ММАЕ" касается полипептидного соединения ауристатина, известного как

монометилауристатин F, или (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептеноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановая кислота, и имеющего формулу:

5

10



или его фармацевтически приемлемой соли или сольватов, или производных.

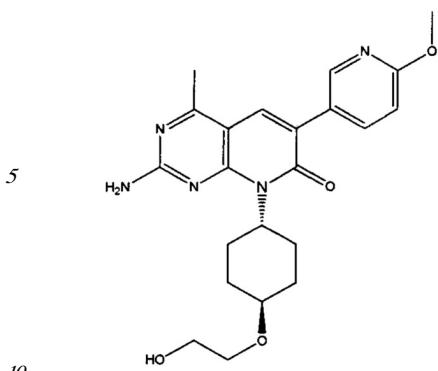
"5T4-ADC" касается молекулы, которая включает полипептид MMAF ауристатина, 15 конъюгированный через линкер "mc" с антителом, специфичным для антигена 5T4.

"Конъюгат анти-5T4 антитело-лекарственное средство" касается анти-5T4 A1 антитела, связано с эффективным ингибитором тунулина монометилауристатин F (MMAF) посредством нерасщепляемого малеимидокапроильного (mc) линкера. Агент нацеливания в анти-5T4 ADC-обозначенный как AlmcMMAF представляет собой 20 гуманизированное IgG1 моноклональное антитело A1, которое специфически распознает человеческий 5T4. (Sapra P, Damelin M, Dijoseph J, Marquette K, Geles KG, Golas J, et al. Long-term tumor regression induced by an antibody-drug конъюгат that targets 5T4, онкоэмбриональный антиген expressed on tumor-initiating cells. Molecular cancer therapeutics. 2013; 12:38-47) Малеимид mcMMAF конъюгируют с цистеинсульфидрильными 25 группами антитела. Полученный в результате ADC содержит среднее соотношение лекарственное средство:антитело 4 моль/моль. Предполагается, что ADC, при интернализации в клетки-мишени катаболизируется в лизосоме, что в результате приводит к высвобождению cysmcMMAF, который ингибирует полимеризацию тубулина, приводящую к апоптозу и гибели клеток.

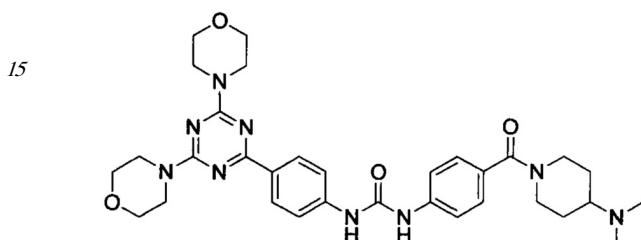
30 Как используется в данном документе, "ингибитор(ы) PI3K/mTOR" касается соединений, которые способны к двойному ингибированию мишней PI3K и mTOR. Такие ингибиторы двойной специфичности связываются как с сайтом связывания АТФ mTOR, так и PI3K. Примеры таких ингибиторов включают вортманин, LY294002, PI-103 (Cayman chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis) и NVP-35 BEZ235 (Novartis). (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009). В некоторых аспектах, ингибитор двойной специфичности будет имидазохиназолином (например, производным имидазо[4,5-с]холина). Типичные анализы того, связывается ли соединение с и/или ингибирует PI3K и/или mTOR, хорошо известны в данной области с уровня техники.

40 Термин "субъект" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяя. Примеры "субъекта" или "пациента" включают, но не ограничиваются этим, человека, крысу, мышь, морскую свинку, обезьяну, свинью, козу, корову, лошадь, собаку, кошку, птицу и домашнюю птицу. В иллюстративном варианте осуществления, субъект или пациент является человеком.

45 Кроме того, среди ингибиторов PI3K/mTOR в клинической разработке, и особый интерес в представленном изобретении вызывают 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтиокси)циклогексил]-6-(6-метоксиридин-3-ил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиrimидин-7(8Н)-он:



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, или производные, и 1-(4-{[4-(диметиламино)пиперидин-1-ил]карбонил}фенил)-3-[4-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевина:



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, или производные. Данное второе соединение на основе триазина также известно как PF-05212384, PF-'384, PF-384, или PKI-587.

Дополнительные термины, используемые в данном документе, включают: 2D (двумерная клеточная культура); 3D (трехмерная клеточная культура); 5T4 (онкоэмбриональный антиген или TPBG); 5T4-ADC (конъюгат 5T4 mAb или mAb к mcMMAF токсину(ам)); CR (полный ответ); CI (комбинационный индекс); ED50 (50% эффективная доза); IC50 (половина максимальной ингибирующей концентрации); IgG (иммуноглобулин G); ИИС (иммуногистохимия); mc (нерасщепляемый малеимидокапроиловый линкер); mcMMAF (монометилауристатин F, связанный с нерасщепляемый малеимидокапроиловым линкером); MMAF-Ome (проницаемый вариант монометилауристатина F); mTOR (мишень рапамицина млекопитающих); PD-901 (МЕК ингибитор PD0325901); PF-384 (двойной ингибитор PI3K/mTOR PF-05212384 или PKI-587); PI3K (фосфоинозитид 3-киназа); PTX (паклитаксел); RNAseq (Секвенирование РНК); SOC (стандарт лечения); TCGA (Атлас генома рака); и WYE-132 (глобальный ингибитор mTOR WYE-125132).

Другим классом ингибиторов активного сайта для использования в представленном изобретении являются селективные ингибиторы mTOR. Данный класс ингибиторов mTOR селективно ингибирует активность mTORC1 и mTORC2 по отношению к одному или нескольким типу I фосфатидилинозитол 3-киназ. Тип I фосфатидилинозитол 3-киназ может быть выбран из, например, PI3 киназы α , PI3 киназы β , PI3 киназы 7, или PI3 киназы 6. Данные ингибиторы активного сайта связываются с активным центром m TOR, но не PI3K. Примеры таких ингибиторов включают Torin1 (Guertin and Sabatini), PP242 (2-(4-амино-1-изопропил-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-1Н-индол-5-ол), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), и AZD8055 (Sparks and Guertin, Oncogene, 29, 2733-2744, 2010, Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009). В некоторых аспектах, ингибитор mTor будет представлять собой пиразолопиримидин. Способы определения селективности ингибиторов mTOR известны в данной области с уровня техники. Другой класс ингибиторов mTOR для использования

в представленном изобретении упоминается в данном документе как "рапалоги". Как используется в данном документе термин "рапалоги" касается соединений, которые специфически связываются с доменом FRB m TOR (FKBP рапамицин-связывающий домен), структурно связаны с рапамицином и сохраняют свойства ингибиования mTOR.

5 Как используется в данном документе, термин "ингибитор PI3K" касается соединения или лиганда, который связывает и ингибирует, по меньшей мере, одну активность PI3K. Белки PI3K могут быть разделены на три класса, класс 1 PI3K, класс 2 PI3K, и класс 3 PI3K. Примеры ингибиторов PI3K включают BKM120 (ингибитор класса 1 PI3K,

10 Novartis), XL147 (ингибитор класса 1 PI3K, Exelixis), GDC0941 (ингибитор класса 1 PI3K, Genentech), GSK1059615 (ингибитор pan-PI3K, GlaxoSmithKline), PX-866 (ингибитор класса 1 изоформы PI3K; p110 α , p110 β , и p110 γ , Oncothyreon), и CAL-101 (класс 1 PI3K ингибитор; изоформа p110 δ , Calistoga).

В дополнение к уже упомянутым в данном документе ингибиторам PI3K или PI3K/

15 mTOR, применимые в связи с представленным изобретением, включают GDC 0941 (PI3Ki) и GDC-0980 (PI3K/mTORi) (Genetech/ Roche); BEZ235 (PI3K/mTORi), BGT226 (PI3K/mTORi), BKM120 (PI3Ki) и эверолимус (Рапалог mTORC1i) (Novartis); XL-767 (PI3K/mTORi), XL-147 (PI3Ki), и XL-388 (Exelixis/ Sanofi-Aventis); AZD 8055 (mTORi) (AstraZeneca); GSK214179 (AKTi) и GSK2126458 (PI3K/mTORi) (GSK); OSI-027 (mTORi)

20 и OXA-01 (mTORi) (OSI); CAL-101 (PI3K δ) и CAL120 (PI3K γ /81) (Calistoga); SF1126 (PI3Ki) (Semafore); INK-128(mTORi), PI3K γ /δ, и PI3K α/β (IntelliKine); SB2312 (PI3K/mTORi) (S*Bio); AR-mTOR-1 (mTORi) и AR-mTOR-26 (mTORi) (ARRAY); PX-866 (PI3Ki) (Oncothyreon); AEZS-126 (PI3Ki) (Aeterna Zentaris); ZSTK474 (японский фонд исследований рака); WX037 (Wilex); NV-128 (mTORi) (Novagen); EZN-4150 (PI3Ki) (Enzon); и соединения,

25 находящиеся в разработке Xcovery, Cellzome, и другие. В дополнение к уже упомянутым в данном документе, ингибиторам FGFR, применимые в связи с представленным изобретением включают AZD-4547 (AstraZeneca); LY2874455 (Lilly); BGJ-398 и довитиниб (Novartis); бриваниба аланинат (BMS); сульфатиниб (Hutchinson Medi Pharm); интеданиб (Boehringer Ingelheim); ленватиниб (Eisai); и TSU-68 (Taiho Pharmaceutical).

30 Как используется в данном документе, "МЕК ингибитор" представляет собой химическое вещество или лекарственное средство, которое ингибирует митоген-активированные ферменты протеинкиназы киназы MEK1 и/или MEK2. Ингибиторы МЕК могут использоваться для воздействия на путь MAPK/ERK, который часто является чрезмерно активным при некоторых раковых заболеваниях. Следовательно, ингибиторы

35 МЕК обладают эффективностью для лечения некоторых видов рака, включая BRAF-мутантную меланому и KRAS/BRAF мутантный колоректальный рак. Ингибиторы МЕК включают: траметиниб (GSK1120212), FDA, одобренный для лечения BRAF-мутантной меланомы, и их изучают в комбинации с ингибитором BRAF дабрафенибом для лечения BRAF-мутантной меланомы; селуметиниб, который в фазе 2 клинических

40 испытаний лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), продемонстрировал улучшенный PFS, с другими клиническими испытаниями, проводимыми для увеальной меланомы и дифференцированной карциномы щитовидной железы; биниметиниб или MEK162, который находился в фазе 1 исследований для рака желчных путей и меланомы; PD-325901, или PCD-901, который был изучен в связи с раком молочной железы, раком

45 толстой кишки, и меланомой; кобиметинибом или XL518, в фазе III исследований, в комбинации с вемурафенибом (Zelboraf(R)), для лечения прогрессирующий меланомы; и CI-1040. Особенно значущим для представленного изобретения является ингибитор MEK PD-325901.

Паклитаксел представляет собой митотический ингибитор, используемый в химиотерапии рака; он и доцетаксел представляют "таксановую" семью лекарственных средств.

В варианте осуществления данного способа, аномальный клеточный рост

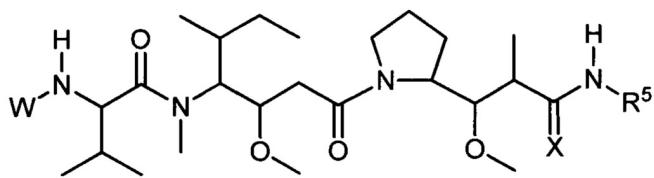
- 5 представляет собой рак, который включает, но не ограничивается этим, мезотелиому, гепатобилиарию (печеночный и билиарный проток), первичную или вторичную опухоль ЦНС, первичную или вторичную опухоль мозга, рак легких (NSCLC и SCLC), плоскоклеточный рак, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстой кишки, рак
- 10 прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, желудочно-кишечные виды (желудочный, колоректальный, и дуоденальный) рака, рак молочной железы, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак
- 15 парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, рак предстательной железы, рак яичника, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной
- 20 нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли оси позвоночника, глиому головного мозга, аденому гипофиза, адренокортикальный рак, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангiocарциному, фиброзаркому, нейробластому, ретинобластому, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака.

- 25 В другом варианте осуществления представленного изобретения рак выбирают из рака легких (NSCLC и SCLC), рака головы или шеи, рака яичников, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака молочной железы, рака почки или мочеточника, почечно-клеточной карциномы, карциномы почечной лоханки, новообразований центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы
- 30 ЦНС, неходжкинской лимфомы, и опухолей оси позвоночника; или выбирают из рака легких (NSCLC и SCLC), рака яичников, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анальной области; или выбирают из рака легких (NSCLC и SCLC), рака яичников, рака толстой кишки и рака прямой кишки; или выбирают из рака мочевого пузыря, карциномы эндометрия, множественной миеломы, желудочного рака, рака легких
- 35 (NSCLC и SCLC), рака молочной железы и плоскоклеточного рака; или выбирают из карциномы эндометрия, желудочного рака, рака легких (NSCLC и SCLC), рака молочной железы и плоскоклеточного рака; или выбирают из карциномы эндометрия, желудочного рака и рака легких (NSCLC и SCLC); или комбинации одного или нескольких из перечисленных выше видов рака.

- 40 В одном варианте осуществления изобретения предусматривается способ лечения рака у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатина и ингибитора PI3K-mTOR, при этом указанный ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502.

- 45 Дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых ингибитор PI3K-mTOR представляет собой PF-384.

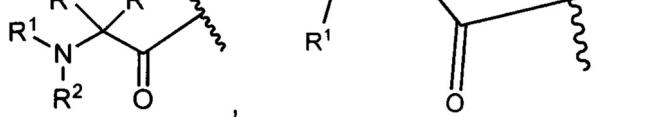
Дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых ауристатин представляет собой соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, или конъюгат антитело-лекарственное средство указанного соединения или соли, или сольвата, где независимо для каждого случая,

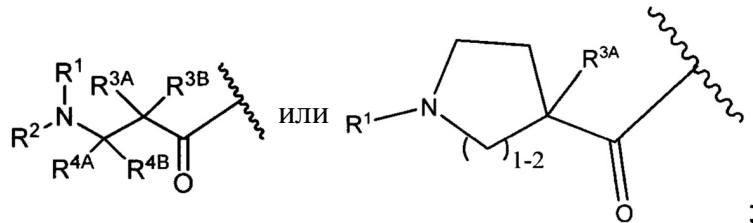
10

W представляет собой



15

20



25

R¹ представляет собой водород, C₁-C₈ алкил или C₁-C₈ галогеналкил;

R² представляет собой водород, C₁-C₈ алкил или C₁-C₈ галогеналкил;

R^{3A} и R^{3B} представляет один из следующих:

(iii) R^{3A} представляет собой водород, C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил, галоген или арилалкил; и

30

R^{3B} представляет собой C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил, арилалкил или галоген; или

(iv) R^{3A} и R^{3B} взятые вместе представляют собой C₂-C₈ алкилен или C₁-C₈ гетероалкилен;

35

R^{4A} и R^{4B} представляет один из следующих:

(iii) R^{4A} представляет собой водород, C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик, C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил или арилалкил; и

40

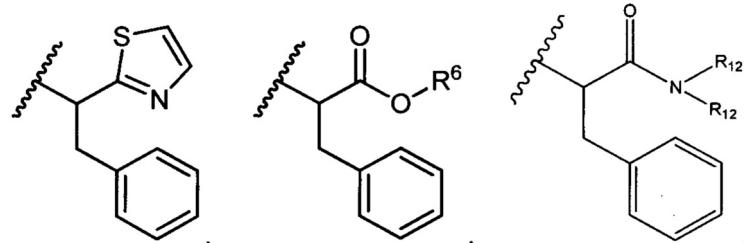
R^{4B} представляет собой водород, C₁-C₈ алкил, C₁-C₈ галогеналкил, C₃-C₈ карбоциклик,

C₁-C₁₀ гетероциклик, арил, гетероарилалкил или арилалкил; или

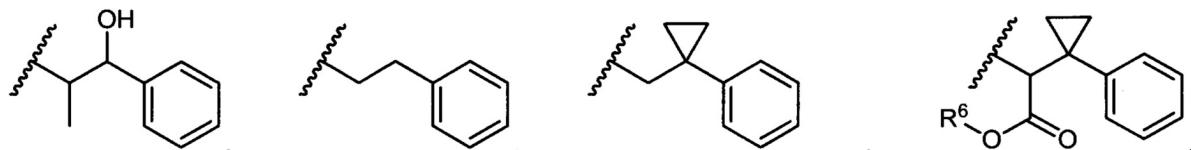
(iv) R^{4A} и R^{4B} взятые вместе представляют собой C₂-C₈ алкилен или C₁-C₈ гетероалкилен;

45

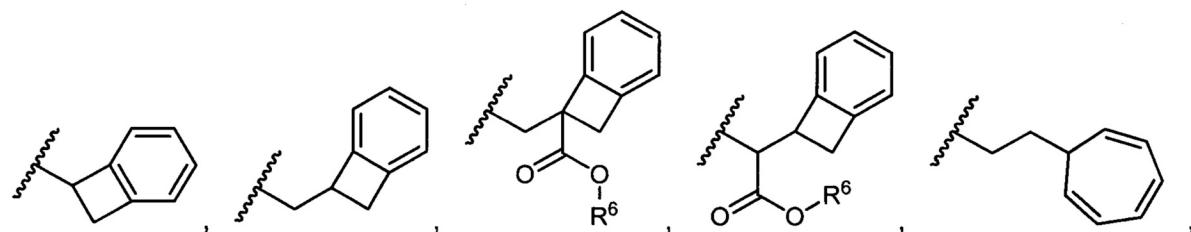
5 R^5 представляет собой



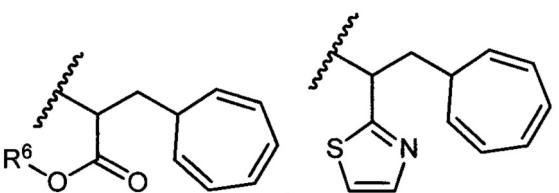
10



15



20



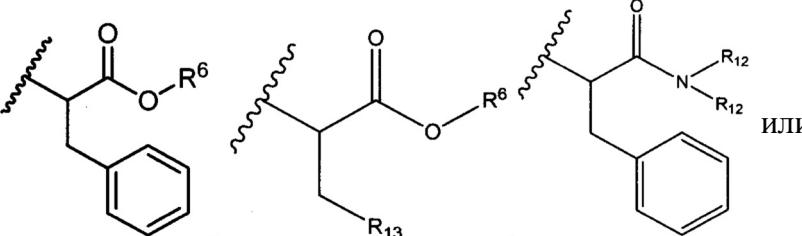
25

C_1 - C_{10} гетероциклик, C_3 - C_8 карбоциклик и C_6 - C_{14} арил, необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 группами, независимо выбранными из группы, состоящей из $-C_1$ - C_8 алкила, $-C_1$ - C_8 алкил- $N(R')$ ₂, $-C_1$ - C_8 алкил- $C(O)R'$, $-C_1$ - C_8 алкил- $C(O)OR'$ - O - $(C_1$ - C_8 алкила), $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)N(R')$ ₂, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, галогена, $-N_3$, $-N(R')$ ₂, $-CN$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHCONH_2$, $-S(=O)_2R'$ и $-SR'$, где каждый R' является независимо выбранным из группы, состоящей из водорода, C_1 - C_8 алкила и незамещенного арила, или два R' могут вместе с азотом, к которому они присоединены, образовывать C_1 - C_{10} гетероциклик;

30

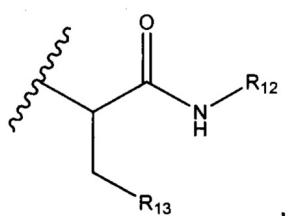
35

или R^5 представляет собой



40

45



необязательно замещенный 1, 2, 3, 4 или 5 группами, независимо выбранными из группы, состоящей из C_1 - C_8 алкила, $-C_1$ - C_8 алкил- $N(R')$ ₂, $-C_1$ - C_8 алкил- $C(O)R'$, $-C_1$ - C_8

алкил-С(О)ОР', -О-(С₁-С₈ алкила), -С(О)Р', -ОС(О)Р', -С(О)ОР', -С(О)N(R')₂, -NHC(О)R', -S(О)R', -S(О)R', -OH, галоген, -N₃, -N(R')₂, -CN, -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(=O)R', -SR' и арилен-R', где каждый R' является независимо выбранным из группы, состоящей из водорода, С₁-С₈ алкила, С₁-С₈гетероциклила, С₁-С₁₀алкилен-С₃-С₈гетероциклила и арила, или два R' могут вместе с азотом, к которому они присоединены, образовывать С₁-С₁₀ гетероциклила;

R⁶ представляет собой водород, -С₁-С₈ алкил, -С₂-С₈ алкенил, -С₂-С₈ алкинил или -С₁-С₈ галогеналкил;

R¹² представляет собой водород, С₁-С₄ алкил, С₁-С₁₀ гетероциклик или С₆-С₁₄ арил;

R¹³ представляет собой С₁-С₁₀ гетероциклик; и

X представляет собой О или S;

при условии, что, когда R^{3A} представляет собой водород, X представляет собой S.

Дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых ауристатин выбирают из конъюгата антитело-лекарственное средство 5T4-ADC, PF-101 и MMAF.

Дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых

ауристатин представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство 5T4-ADC.

Дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых ауристатин представляет собой ауристатин-101.

Дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых ауристатин представляет собой MMAF.

Дополнительные варианты осуществления изобретения включают способы лечения рака, где рак представляет собой рак легких.

Дополнительные варианты осуществления изобретения включают способы лечения рака, где рак представляет собой рак молочной железы.

Еще дополнительные варианты осуществления изобретения включают те, в которых

ауристатин и ингибитор PI3K-mTOR вводятся одновременно или последовательно.

Последовательное введение может происходить в каком-либо порядке - ауристатин вводится первым или вторым.

Варианты осуществления изобретения включают фармацевтическую композицию, которая включает: количество ауристатина, или его фармацевтически приемлемой соли; количество PF-384 или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Вариант осуществления изобретения также включает способы лечения рака у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатина и ингибитора MEK.

Дополнительные варианты осуществления включают те, в которых ингибитор MEK представляет собой PD-901.

Дополнительные варианты осуществления включают те, в которых ауристатин выбирают из конъюгата антитело-лекарственное средство 5T4-ADC, PF-101 и MMAF.

В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой конъюгат

антитело-лекарственное средство 5T4-ADC.

В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой ауристатин-101.

В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой MMAF.

В комбинациях ауристатин/МЕК, варианты осуществления включают те, в которых рак представляет собой рак легких, и те, в которых рак представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ауристатин и ингибитор МЕК

5 вводятся одновременно или вводятся последовательно, и если последовательно, то в каком-либо порядке.

В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает фармацевтическая композиция, которая включает: количество ауристатина, или его фармацевтически приемлемой соли; количество PD-901 или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает способ лечения рака у субъекта, который включает одновременное введение субъекту, нуждающемуся в этом, ауристатин и таксан, где ауристатин представляет собой ауристатин-101, и где таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел. Данные способы включают способы лечения рака легких и способы лечения рака молочной железы.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения ауристатин-101 и таксан вводятся одновременно или вводятся последовательно, и если последовательно, то в каком-либо порядке.

Изобретение, кроме того, предусматривает фармацевтические композиции, которые

20 включают количество ауристатина, или его фармацевтически приемлемой соли; количество таксана, или его фармацевтически приемлемой соли; и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

25 В некоторых вариантах осуществления описанном в данном документе, противораковый эффект, достигаемый указанным одновременным введением, является большим, чем противораковые эффекты, достигаемые за счет введения указанных первой и второй фармацевтических композиций не одновременно.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается дозированная форма для лечения рака у млекопитающего, которая включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль; (б) ингибитор PI3K-mTOR, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

35 В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается дозированная форма для лечения рака у млекопитающего, которая включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль; (б) ингибитор МЕК, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный МЕК ингибитор представляет собой PD-901; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

40 В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается дозированная форма для лечения рака у млекопитающего, которая включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный ауристатин представляет собой ауристатин-101; (б) таксан, или его фармацевтически приемлемую соль, при этом указанный таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел; и (с) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

45 В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается набор для достижения терапевтического эффекта у млекопитающего, где указанный набор

включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме; (б) ингибитор PI3K-mTOR, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при

этом указанный ингибитор PI3K-mTOR выбирают из PF-384 и PF-502; и (с) средство для содержания указанных первой и второй дозированных форм.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается набор для достижения терапевтического эффекта у млекопитающего, где указанный набор

5 включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме; (б) ингибитор MEK, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при этом указанный MEK ингибитор представляет собой PD-901; и (с) средство для

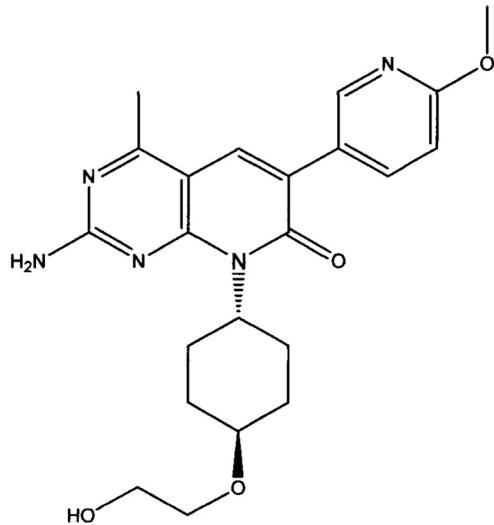
10 содержания указанных первой и второй дозированных форм.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается набор для достижения терапевтического эффекта у млекопитающего, где указанный набор

15 включает: (а) ауристатин, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при этом указанный ауристатин представляет собой ауристатин-101; (б) таксан, или его

20 фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в первой единичной дозированной форме, при этом указанный таксан представляет собой паклитаксел или доцетаксел; и (с) средство для содержания указанных первой и второй дозированных форм. В одном варианте осуществления

25 представленное изобретение касается 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метоксиридин-3-ил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиrimидин-7(8Н)-она (Соединение 1А):

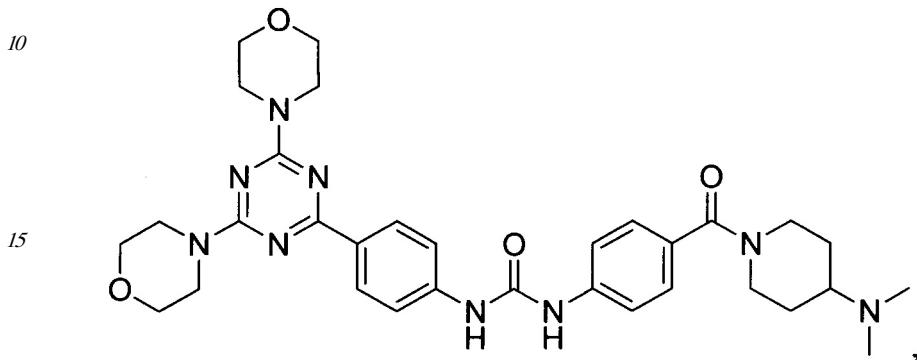


30 описанного в публикации международной патентной заявки № WO 2008/002578, США публикации №US2008 0090801A1 и патенте США №7,696,213, которые включены в

35 данный документ в виде ссылки. Соединение 1А является структурно новым, эффективным, АТФ-конкурентоспособным и обратимым двойным ингибитором как класса I PI3K, так и mTOR. Соединение 1А продемонстрировало высокую степень селективности для семейства PI3K, как показано при отсутствии активности в панели из 81 протеинкиназ и класса III семейства PI3K hVps34 с использованием скринингового сервиса университета Dundee и киназы Invitrogen. Никакой значительной ингибирующей 40 активности не наблюдалось ни для одной из оцененных киназ вплоть до 10 мкМ (>500 селективности). В исследованиях ФК in vivo на крысах соединение 1А продемонстрировало низкий клиренс и хорошую пероральную биодоступность (F(%)) 45 56 +/- 16). Соединение 1А продемонстрировало умеренное связывание с белком плазмы

у крыс с несвязанной фракцией (Fu) 20,2%. Следовательно, несвязанный клиренс 1А является низким. Данные свойства перевели для того, чтобы продемонстрировать устойчивую эффективность *in vivo*, и соединение 1А обладает активностью *in vivo* в мышиных моделях ксенотрансплантата, имплантированного с человеческими раковыми 5 клеточными линиями с аберрациями пути PI3K.

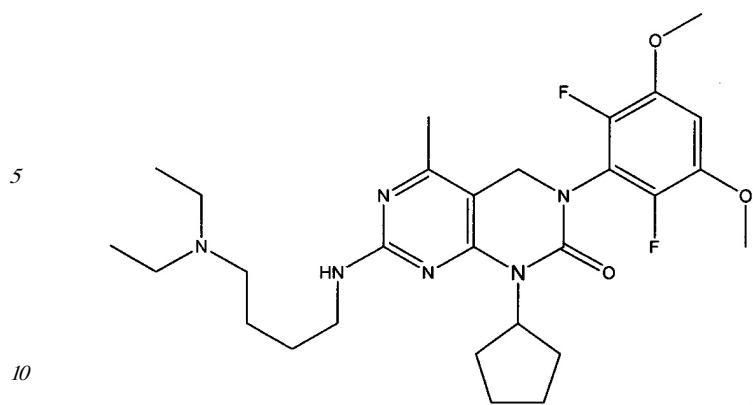
В другом варианте осуществления представленное изобретение касается 1-(4-{[4-(диметиламино)пиперидин-1-ил]карбонил}фенил)-3-[4-(4,6-диморфолин-4-ил-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевины (Соединение 1В)



описанного в публикации международной патентной заявки № WO 2009/044774,

20 США публикации № US2009-0291079A1, и патенте США №8,039,469, которые включены в данный документ в виде ссылки. Соединение 1В представляет собой (IV) вводимый высокоэффективный, pan-PI3K7 mTOR ингибитор. Химически, соединение 1В представляет собой 2, 4-бисморфолино-6-арилуреидотриазин, который связывается в АТФ-связывающем кармане фермента PI3K. Ключевыми связывающими 25 взаимодействиями являются Н-связи между морфолиновым кислородом и шарнирной областью Val 851, кислородом мочевины с аминогруппой Lys-802 и двойной Н-связь между обоими уреидо-NH с карбоксилатом Asp 810. Соединение 1В является высокоселективным для PI3K и PIKK, о чем свидетельствует его киназный скрининг селективности (Invitrogen) против 236 киназ. Соединение имеет сильный 30 антитрополиферативный эффект в более чем 50 различных человеческих опухолевых клеточных линиях при $IC_{50} < 100$ нМ. Кроме того, соединение 1В индуцировало апоптоз в раковых клеточных линиях с повышенным сигналом PI3K и подавляло фосфорилирование нижележащих эффекторов PI3K/mTOR, таких как АКТ. В одной из 35 наиболее чувствительных клеточных линий MDA-MB-361, апоптоз был индуцирован при 30 нМ соединения 1В через 4 часа, о чем свидетельствует подавление расщепленного PARP. Данные результаты *in vitro* переносились на результаты *in vivo*, в которых соединение 1В ингибировало рост опухоли в ксенотрансплантатных моделях молочной 40 железы (BT474, MDA-MB-361), толстой кишки (HCT116), легкого (H1975), и глиомы (U87MG). Соединение 1В, дозированное один раз в неделю по 25 мг/кг, уменьшало большие (1000 mm^3) MDA-MB-361 опухоли и подавляло повторный рост. Данная 45 регрессия опухоли коррелировала с регрессией фосфорилированного Akt в модели MDA-MB-361.

В еще одном варианте осуществления представленное изобретение касается 1-цикlopентил-7-(4-диэтиламинобутиламино)-3-(2,6-дифтор-3,5-диметоксифенил)-3,4-дигидро-1Н-пириимиdo[4,5-d]пириидин-2-она:



5 описанного в публикации международной патентной заявки № WO 2004/011465, США публикации № US2004-0019210A1, и патенте США №7,196,090, которые включены в данный документ в виде ссылки. Соединение 2 представляет собой перорально 15 доступный, эффективный и высокоселективный низкомолекулярный ингибитор семейства FGFR тирозинкиназ: FGFR1, 2, 3, и 4. Соединение 2 является селективно эффективным против генетически измененных клеточных линий FGFR и демонстрирует предпочтительную к нему чувствительность у клеточных линий рака желудка и легких как *in vitro*, так и *in vivo*. Соединение 2 высокую киназную селективность по отношению 20 к >60 исследованных киназ. В клеточных анализах соединение имеет >100-кратную селективность по отношению к VEGFR2 по сравнению с FGFR2, и, как было показано, ингибирует фосфорилирование FGFR и другие в прямом направлении маркеры как *in vitro*, так и *in vivo*. Соединение, как было показано, ингибирует рост опухоли *in vivo* в различных моделях ксенотрансплантатной опухоли, которые характеризуются 25 амплификацией или мутацией гена FGFR. Соединение 2 обладает подобными лекарственному средству фармацевтическими свойствами, и, как ожидается, имеет фармакокинетический профиль, пригодный для перорального введения QD (один раз в день) или BID (два раза в день).

30 Термин "лечение", как используется в данном документе, если не указано иначе, означает реверсию, облегчение, ингибирование прогрессирования, или предотвращение расстройства или состояния, к которому применяется такой термин, или один или несколько симптомов такого расстройства или состояния. Термин "лечение", как используется в данном документе, если не указано иначе, касается действия лечения, как термин "лечение" определяется непосредственно выше.

35 Пациент, который должен лечиться в соответствии с настоящим изобретением, включает какое-либо теплокровное животное, такое как, но не ограничиваясь этим, человек, лошадь, собака, морская свинка или мышь. Например, пациент является человеком. Квалифицированные специалисты в области медицины могут легко идентифицировать отдельных пациентов, которые страдают от рака, и которые 40 нуждаются в лечении.

45 Термины "одновременное введение" или "введение одновременно", как используется в данном документе, касаются введения нескольких терапевтических соединений таким образом, что отдельные терапевтические соединения присутствуют в субъекте в одно и тоже время, в том числе во время перекрывающихся периодов времени. Одновременное введение, или введение одновременно, также может относиться к периоду или курсу 50 лечения, в течение которого пациент получает несколько терапевтических соединений, независимо от того, присутствуют ли отдельные терапевтические соединения у индивидуума в тот же или перекрывающийся период времени.

Последовательное введение относится к курсу лечения, при котором несколько терапевтических соединений вводят последовательно, таким образом, что пациенту предоставляется первое терапевтическое соединение в течение первого предписанного периода времени и второе терапевтическое соединение в течение второго предписанного 5 периода времени, и так далее, с периодом или без периода, в течение которого никакое терапевтическое соединение не вводится.

В одном варианте осуществления данного способа, рак включает, но не ограничивается этим: мезотелиому, гепатобилиарию (печеночных и билиарных проток), первичную или вторичную опухоль ЦНС, первичную или вторичную опухоль мозга,

- 10 рак легких (NSCLC и SCLC), плоскоклеточный рак, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, желудочно-кишечные виды (желудочный, колоректальный, и дуоденальный) рака, рак молочной железы, рак матки, карциному фалlopиевых труб, карциному эндометрия,
- 15 карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, рак предстательной железы, рак яичника, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз,
- 20 лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли оси позвоночника, глиому головного мозга, аденому гипофиза, адренокортикальный рак, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангiocарциному,
- 25 фибросаркому, нейробластому, ретинобластому, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака.

В одном варианте осуществления представленного изобретения рак выбирают из рака легких (NSCLC и SCLC), рака головы или шеи, рака яичников, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака молочной железы, 30 рака почки или мочеточника, почечно-клеточной карциномы, карциномы почечной лоханки, новообразований центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, неходжкинской лимфомы, опухолей оси позвоночника, или комбинации одного или нескольких из перечисленных выше видов рака.

Термин "синергический", как используется в данном документе, касается

- 35 терапевтической комбинации, которая является более эффективной, чем аддитивные эффекты двух или больше отдельных агентов. Определение синергетического взаимодействия между, например 5T4-мcMMAF (или MMAF, или другим ауристатином) и одним или несколькими химиотерапевтическими средствами может быть основано на результатах, полученных из анализов, описанных в данном документе. Результаты 40 данных анализов анализируются с использованием комбинационного метода Чоу и Талалая и дозо-эффективного анализа с программным обеспечением CalcuSyn для того, чтобы получить комбинированный индекс «CI» (Chou and Talalay (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55). Комбинации, предлагаемые данным изобретением, были оценены в нескольких системах анализа, и данные могут быть проанализированы с использованием 45 стандартной программы для количественного определения синергизма, аддитивизма и антагонизма среди противораковых агентов. Предпочтительно использовать программу, описанную Чоу и Талалая, в "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy," Academic Press, 1987. Значения индекса комбинации (CI) меньше, чем 0,8

указывают на синергизм, значения, превышающие 1,2, указывают на антагонизм и значения между 0,8 и 1,2 указывают на аддитивные эффекты. Комбинированная терапия может обеспечить «синергизм» и доказать "синергический" эффект, то есть эффект, достигаемый при совместном использовании активных ингредиентов, чем сумма

5 эффектов, которые возникают в результате использования соединений по отдельности. Синергический эффект может быть достигнут, когда активными ингредиентами являются: (1) совместное сформулированные и введенные или доставленные одновременно в комбинированной единичной дозированной композиции; (2),

10 доставленные чередованием в виде отдельных препаратов; или (3) каким-либо другим режимом. При доставке в альтернативной терапии синергический эффект может быть достигнут, когда соединения вводятся или доставляются последовательно, например, различными инъекциями в отдельных шприцах. В общем, во время альтернативной терапии эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть последовательно по времени.

15 При измерении *in vivo* или терапевтического синергизма одно измерение синергизма известно как синергизм "превышения по самому высокому одиночному агенту".

Синергизм превышения по самому высокому одиночному агенту возникает там, где комбинация фиксированных доз является таковой, что она превосходит обе дозы составляющих компонентов, тогда это называется "превышением по самому высокому 20 одиночному агенту", (смотрите: FDA's policy at 21 CFR 300.50, которая использует такой метод для одобрения комбинированных лекарственных препаратов; и, Borisy et al. (2003) *Proceedings of the National Academy of Science.*) Конечно, использование "синергизма" в данном документе также охватывает *in vivo* синергизм, как измерено с использованием дополнительных и/или альтернативных способов.

25 Некоторые аспекты изобретения связаны с введением фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль", как используется в данном документе, если не указано иначе, включает соли кислотных или основных групп, которые могут присутствовать в соединениях согласно представленному изобретению. Типичные соли включают гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, нитрат,

30 ацетат, оксалат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, борат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малаат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и тому подобное. Они могут включать катионы на основе щелочных и щелочноземельных металлов, таких как натрий, литий, калий, кальций, магний и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммиака,

35 четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное (смотрите, например, S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," *J. Pharm. Sci.*, 1977; 66: 1-19, который включен в данный документ в качестве ссылки); и *Handbook of Pharmaceutical Salts*, P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth

40 (Eds.), опубликованные совместно VHCA (Zurich, Switzerland) & Wiley-VCH (Weinheim, Germany) 2002. Этот термин также включает фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли, а также соответствующие соединения могут встречаться в виде гидратов или сольватов, и гидраты, и сольваты также входят в объем изобретения.

45 Эффективное количество соединения (или его фармацевтически приемлемой соли), как может пониматься, включает количество, достаточное для предотвращения или ингибирования роста опухолевых клеток или прогрессирования метастазирования рака в комбинации согласно представленному изобретению. Терапевтическая или фармакологическая эффективность доз и режимов введения также может быть

охарактеризована как способность индуцировать, усиливать, поддерживать или продлевать ремиссию у пациентов, испытывающих специфические опухоли.

Соединения, используемые в способе, или комбинация согласно представленному изобретению может вводиться в дозировках или дозах, обычно применяемых в

- 5 клинических условиях. Квалифицированные специалисты в данной области будут способны определить, в соответствии с известными способами, подходящее эффективное количество или дозировку каждого соединения, используемого в комбинации согласно представленному изобретению, для введения пациенту принимая во внимание такие факторы, как возраст, масса, общее состояние здоровья, вводимое соединение, пути 10 введения, природа и развития рака, требующего лечения, и присутствие других лекарственных средств.

Введение соединений комбинации согласно представленному изобретению может быть осуществлено каким-либо способом, который позволяет доставлять соединения к месту действия. Данные способы включают пероральные пути, интрадуоденальные 15 пути, парентеральную инъекцию (которая включает внутривенную, подкожную, внутримышечную, внутрисосудистую или инфузционную), местное и ректальное введение.

- Соединения способа или комбинации согласно представленному изобретению могут 20 быть сформулированы перед введением. Препарат предпочтительно будет адаптирован к конкретному способу введения. Данные соединения могут быть сформулированы с фармацевтически приемлемыми носителями, как известно в данной области из уровня 25 техники, и вводятся в широком спектре дозированных форм, известных в данной области. При изготовлении фармацевтических композиций согласно представленному изобретению активный ингредиент будут обычно смешивать с фармацевтически приемлемым носителем, или разбавлять носителем, или заключать в носитель. Такие 30 носители включают, но не ограничиваются этим, твердые разбавители или наполнители, эксципиенты, стерильные водные среды и различные нетоксичные органические растворители. Дозированные единичные формы или фармацевтические композиции включают таблетки, капсулы, такие как желатиновые капсулы, пилюли, порошки, гранулы, пероральные водные и неводные растворы и суспензии, таблетки для рассасывания, пастилки, твердые конфеты, спреи, кремы, мази, суппозитории, желе, гели, пасты, лосьоны, мази, инъекционные растворы, эликсиры, сиропы и парентеральные растворы, упакованные в контейнеры, адаптированные для разделения в отдельные дозы.

- Парентеральные препараты включают фармацевтически приемлемые водные или 35 неводные растворы, дисперсию, суспензии, эмульсии и стерильные порошки для их получения. Примеры носителей включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), растительные масла и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Текущее состояние может поддерживаться за счет использования покрытия, такого как лецитин, поверхностно-активное вещество, или поддержания 40 соответствующего размера частиц. Типичные формы для парентерального введения включают растворы или суспензии соединений согласно изобретению в стерильных водных растворах, например водные растворы пропиленгликоля или декстрозы. Если необходимо, такие лекарственные формы могут быть соответствующим образом забуферированы.

- 45 Кроме того, смазывающие агенты, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк, часто используются для таблетирования. Твердые композиции аналогичного типа также могут быть использованы в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах. Предпочтительные материалы включают лактозу или молочный сахар и

полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой. Когда желательными являются водные суспензии или эликсиры для перорального введения, активное соединение в них может быть смешено с различными подслащающими или ароматизирующими агентами, окрашивающими веществами или красителями и, если необходимо,

5 эмульгирующими агентами или суспендирующими агентами вместе с разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль, глицерин или их комбинации.

Способы получения различных фармацевтических композиций с определенным количеством активного соединения известны или будут очевидны для квалифицированных специалистов в данной области. Например,смотрите Remington's 10 Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 15th Edition (1975).

Способы, композиции и наборы в соответствии с представленным изобретением могут обеспечить улучшенный уровень подавления противораковой активности по сравнению с традиционными противораковыми лечениими, включающими соединение 1A или его фармацевтически приемлемую соль, или соединение 1B или его 15 фармацевтически приемлемую соль по отдельности, или соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль по отдельности. Таким образом, возможным может быть использовать противораковые средства согласно изобретению в дозах, которые были бы недостаточными (т.е. субтерапевтическими) в отсутствие другого противоракового агента при сохранении того же или адекватного уровня 20 противораковой активности с меньшим количеством побочных эффектов.

В способах, композиции и наборах согласно представленному изобретению ауристатин или его фармацевтически приемлемая соль могут вводиться перорально («п.о.») в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг один раз в день. Например, в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг один раз в день, от приблизительно 0,5 25 до приблизительно 15 мг один раз в день, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг один раз в день или приблизительно 2-8 мг один раз в день. В одном варианте осуществления заявляемое терапевтическое соединение может вводиться перорально («п.о.») в дозе приблизительно 2-8 мг один раз в день или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг один раз ежедневно. Введение может также осуществляться более или менее часто, 30 например, два раза в день, один раз каждые 2, 3, 4, 5 или 6 дней, раз в две недели, один раз в месяц или в соответствии с предписаниями. В другом варианте осуществления терапевтическое соединение можно вводить в.в. (внутривенно) путем инфузии.

В способах, композициях и наборах согласно представленному изобретению терапевтическое(ие) соединение(я), включая его(их) фармацевтически приемлемую 35 соль, может вводиться в дозе от приблизительно 10 до приблизительно 500 мг посредством внутривенной инфузии в течение приблизительно от 15 минут до приблизительно 3 часов один раз в неделю, предпочтительно посредством внутривенной инфузии в течение приблизительно 30 минут. Введение может также осуществляться более или менее часто, например один раз в день, один раз каждые 2, 3, 4, 5 или 6 дней, 40 раз в две недели, один раз в месяц или в соответствии с предписаниями. Соединение ауристатина в заявленных способах и комбинациях может быть введено перед, во время или после введения другого соединения комбинации. Такое одновременное введение (совместное введение) может быть в отдельных дозированных формах или в одной и той же лекарственной форме.

45 В некоторых случаях уровни дозировки ниже нижнего предела указанного выше диапазона могут быть более чем достаточными, в то время как в других случаях могут использоваться более высокие дозы, как определено квалифицированными специалистами в данной области.

Практика способов, композиций и наборов согласно представленному изобретению может быть выполнена с помощью различных режимов введения. В одном аспекте соединения можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель. Повторение режимов введения может быть проведено по мере необходимости для достижения желаемого снижения или уменьшения раковых клеток.

Изобретение также касается набора, который включает ауристатин и другое терапевтическое соединение (включая, конечно, фармацевтически приемлемые соли одного или обоих) и инструкции для введения терапевтических агентов. В одном варианте осуществления в инструкциях подробно излагаются и определяются способы введения терапевтических агентов, например, для одновременного или последовательного введения терапевтических агентов согласно представленному изобретению. В другом варианте осуществления, набор предназначен для лечения рака, который включает, но не ограничивается этим, мезотелиому, гепатобилиарию (печеночных и билиарных проток), первичную или вторичную опухоль ЦНС, первичную или вторичную опухоль мозга, рак легких (NSCLC и SCLC), плоскоклеточный рак, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, желудочно-кишечные виды (желудочный, колоректальный, и дуоденальный) рака, рак молочной железы, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, рак предстательной железы, рак яичника, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли оси позвоночника, глиому головного мозга, аденому гипофиза, адренокортикальный рак, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангикарциному, фиброзаркому, нейробластому, ретинобластому, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака; или более конкретно рак легких (NSCLC и SCLC), рак головы или шеи, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак молочной железы, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, неходжкинскую лимфому, опухоли оси позвоночника, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака; или более конкретно рак легких (NSCLC и SCLC), рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака; или более конкретно рак легких (NSCLC и SCLC), рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака; или рак мочевого пузыря, карциному эндометрия, множественную миелому, рак желудка, рак легких (NSCLC и SCLC), рак молочной железы и плоскоклеточный рак, или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака; или карциному эндометрия, рак

желудка и рак легких (NSCLC и SCLC), или комбинацию одного или нескольких из перечисленных выше видов рака.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Клеточные линии и реагенты

5 Человеческие опухолевые клеточные линии NCI-H1975, Calu-6, NCI-H358, HCC2429, MDA-MB-468, MDA-MB-231, CAOV-3, TOV-112D, OV-90, OVCAR-3, SKOV-3, HT-29, NCI-N87, Raji, Ramos были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC). MDAMB361-DYT2 клетки MDAMB435/5T4 представляют собой клетки, стабильно трансфицированные человеческим 5T4. Описанными были 37622A1 NSCLC 10 полученный от пациента ксенотрансплантат (PDX), и установление и характеристика первичной свободной от сыворотки культуры TUM622 от 37622A1 (6). Каждую клеточную линию культивировали в ее стандартной среде, как рекомендовано ATCC. Для исследований *in vitro*, химиотерапевтические лекарственные средства были получены от Sigma-Aldrich. Эрлотиниб и пеметрексед были приобретены у Selleck Chemicals. PF- 15 05212384 (PKI-587), PD-0325901 (PD-901), O-Ме-MMAF (MMAF) и ауристатин 101 получали в соответствии с известными способами из коммерчески доступных реагентов. Получение 5T4-ADC (A1mcMMAF) было описано ранее в US 20120251558A.

Пример 2: Анализы 2D клеточной пролиферации

Клетки высевали в 96-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning) и 20 обрабатывали различными концентрациями соединений в течение 4 дней, определяли с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter Glo (Promega) и измеряли с использованием планшетного ридера Victor X3 (Perkin Elmer). Данные были нормализованы по контрольной группе (пустой вектор или ДМСО). Значения IC50 определяли как концентрацию, которая вызывала 25 ингибирование роста на 50%. Значения IC50 рассчитывались с использованием логистической нелинейной регрессии, модель №203 с XL сглаживанием v4,2 (IDBS, Guldford, Surry, UK). Все экспериментальные точки были установлены по трем повторяющимся лункам и независимо выполнялись в двух повторах.

Пример 3: Анализ сфераида 3D клеточной пролиферации

30 96-луночные планшеты с прозрачным дном с 40 мкл/лунку 100% BD матригелевой матрицы, сниженного фактора роста (# 354230). Клеточная суспензия MDA-MB-468 или H-1975 при конечной концентрации 3000/лунка в 2% матригеле была наложена поверх 100% матригелевой основы. Клеткам давали расти и образовывать сфераиды, и обработку лекарственным средством начиналось, когда сфераиды достигали ~100 35 мкМ в размере (как измерено с помощью световой микроскопии). Для однократной дозы и определения IC50, дублирующие лунки сфероидов обрабатывали соединением или ADC для того, чтобы получить 9 точек, 2-кратные кривые доза-ответ в течение 7 дней. Пролиферацию измеряли на 7-й день после обработки с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter Glo (Promega # G7570).

40 Пример 4: Анализ синергизма

Влияние комбинаций лекарственных средств оценивали с использованием анализа медианного эффекта Чжоу-Талалая (28). Клетки обрабатывали каждым лекарственным средством по отдельности и в комбинации в двух независимых 96-луночных планшетах в диагональном матричном формате, и пролиферацию измеряли с использованием 45 набора CellTiter Glo (Promega). Результаты были выражены как выжившие фракции (пораженная фракция, Fa), основываясь на измеренных количествах люминесценции обработанных образцов, по сравнению с результатами необработанных контролей. 7 диагоналей, представляющих различные кривые доза - эффект с фиксированными

соотношениями лекарственного средства использовались для измерения комбинационных индексов (CI) для каждой из комбинаций с применением программного обеспечения Calcusyn (Biosoft, Ferguson, MO). В каждом эксперименте индексы CI на уровнях ED50 были усреднены для трех кривых доза - эффект, которые имели от 7 до 8 точек данных. Смотрите ФИГ. 1.

5 Пример 5: Анализ импеданса

Рост клеток контролировали в реальном времени с использованием системы xCELLigence RTCA MP (Acea Biosciences Inc, San Diego, CA) с использованием 96 Е-планшетов. Система xCELLigence детектирует изменения в клеточных количествах 10 путем измерения электрического импеданса и генерирует значения клеточного индекса, которые непосредственно связаны с количеством клеток, прикрепленных к дну лунок (29). Базовый клеточный индекс планшетов был получен до посева клеток. Клетки высеивали при концентрации 4000 клеток/лунку в объеме 50 мл и инкубировали в течение 15 ночи. В день дозирования (день 1) соединения добавляли в указанных концентрациях, и показания импеданса контролировались в течение ~250 часов. Значения индекса импеданса для предметов, обработанных лекарственным средством или носителем, могут быть нанесены на график могут быть нанесены или сопоставлены с течением времени.

Пример 6: Анализ апоптоза каспазы 3/7

20 Клетки MDA-468 и H-1975 высеивали при концентрации 15000 на лунку в 96-луночном планшете за день до обработки. Через 16, 24 или 48 часов после обработки, измеряли активность каспазы 3/7 с использованием анализа Каспаза-Glo 3/7 (Promega G8092, Madison, USA) в соответствии с протоколом производителя. В дубликатном планшете жизнеспособность клеток определяли с использованием люминесцентного анализа 25 клеточной жизнеспособности CellTiter-Glo (Promega G7573, Madison, USA). Увеличение активности каспазы 3/7 в образцах, обработанных лекарственным средством, было сначало выражено по сравнению с контролем, обработанным носителем, нормализовано по жизнеспособности и выражено в виде индуцирования сгиба по сравнению с контролем, обработанным носителем.

30 Пример 7: Анализ клеточного цикла

Клетки получали для анализа комбинированного клеточного цикла и фосфорогистонного Н3 анализа с использованием набора FlowCollect Bivariate Cell Cycle (Millipore, Cat. No. FCCH025103), в соответствии с протоколом производства. Образцы 35 анализировали с использованием проточной цитометрии с применением прибора FACS Calibur (BD Biosciences) и программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Ashland OR).

Пример 8: Эффективность ксенотранспланта

Самки бестимусных nu/nu мышей (18-23 г) были получены от Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Мышам инъекционно подкожно вводили опухолевые клетки, и животным с постадийными опухолями вводили внутривенно с физиологическим 40 раствором (носителем), 5T4-ADC, PF-384, паклитакселом или комбинациями 5T4-ADC плюс PF-384, 5T4-ADC плюс паклитаксел. ADC вводили на основе содержания белка mAb 2 или 3 мг Ab/кг на графике Q4D × 4 (каждые 4 дня), с 8-10 мышами на группу. 5T4-ADC, PF-384 и паклитаксел дозировали в клинически значимых дозах (CRD), которые 45 были экстраполированы на воздействие, достигаемое данными лекарственными средствами у людей. Все процедуры с использованием мышей были одобрены комитетом Pfizer Institutional Animal Care and Use Committee в соответствии с установленными руководящими принципами. Периоды времени до конечной точки (время до отсутствия опухоли или показатель утроения опухоли) использовались для сравнения групп,

получавших лекарственное средство. Т-тест использовался для сравнения индивидуальных объемов опухолей, как указано в легендах фигур.

Пример 9: Комбинации нагрузки 5T4-ADC или ауристатина In Vitro

Цитотоксическую активность *in vitro* оценивали для 5T4-ADC или полезных нагрузок

5 ауристатина в комбинации с различными стандартными агентами по уходу (SOC) или выбранными ингибиторами сигналов в клеточных линиях рака легких, рака молочной железы и рака яичников. Клеточные линии для каждой индикации опухоли были выбраны на основании статуса 5T4, как описано ранее (Sapra et al., 2013). Значения IC50 для каждого агента в обычном анализе 2D пролиферации определяли до начала 10 исследования комбинации лекарственных средств. Способ Чоу-Талала использовался для расчета значений CI при различных уровнях доза - эффект. Усредненные значения CI из независимых экспериментов представлены в таблице 2-5 и на Фиг. 1A и 1B). Значения CI<0,9 считались свидетельством синергизма; 0,9-1,1, аддитивных эффектов; 15 CI>1,1, antagonизма. Существовал сильный синергетический эффект, когда 5T4-ADC был скомбинирован с PF-384, PD-901, пеметрекседом, эрлотинибом или таксанами. Хотя большая часть клеточных линий была относительно нечувствительна к PD-901 или к эрлотинибу по отдельности, как чувствительные, так и нечувствительные клетки демонстрировали синергические взаимодействия (таблица 2-5). Аддитивность обычно наблюдалась, когда 5T4-ADC комбинировали с соединениями платины, тогда как 20 умеренная аддитивность или antagonism наблюдалась между 5T4-ADC и адриамицином, эпирецином или гемцитином. Кроме того, включенными были ауристатины или дополнительные лекарственные средства ингибитора микротрубочек для комбинированных анализов. Характер синергических или аддитивных взаимодействий также наблюдался между проницаемой для клеток версией полезной нагрузки, MMAF- 25 OMЕ или ауристатин-101 и указанными выше агентами. В сочетании с PF-384 в меньшем подмножестве клеточных линий паклитаксел или винорелбин также проявляли синергические или аддитивные отношения. Высокоселективный ингибитор киназы mTOR WYE-132 (таблица 5) усиливал антитролиферативное действие ауристатина,-101 в клетках HT-29, N87, открытие, которое подтверждает мнение, что снижение функции 30 mTOR глобально может быть, по меньшей мере, в части, ответственной за широкий синергетический эффект, наблюдаемый между ауристатинами и PF-384. Тот факт, что более сильные синергетические эффекты между агентами на основе ауристатина и PF-384 или паклитакселем были идентифицированы в более широком диапазоне клеточных линий и типов опухолей, предполагает, что данные комбинации могут обеспечить 35 потенциальное клиническое преимущество.

Для того, чтобы понять кинетику синергических взаимодействий, был выполнен динамический мониторинг роста клеток с использованием системы xCelligence, который обеспечивает измерения эмпеданса и адгезии в реальном времени. Клетки MDA-468 обрабатывали одиночными лекарственными средствами по отдельности 5T4-ADC, PF- 40 384 или комбинацией 5T4-ADC/PF-384 при предварительно определенных субоптимальных дозах лекарственного средства для того, чтобы позволить более точную визуализацию повышенных эффектов в течение длительного периода времени. В течение курса приблизительно 11 дней наблюдалось минимальное ингибирование клеточного роста с использованием 5T4-ADC, или PF-384 при исследуемых 45 концентрациях (Фиг. 2A, B). Однако, ингибирование пролиферации, вызванное комбинацией 5T4-ADC/PF-384 было значительно более выраженным, чем эффекты одного из индивидуальных агентов по отдельности. Улучшение было отмечено непосредственно после добавления комбинированной смеси, эффект которого

продолжался в течение всего времени эксперимента. Аналогичные результаты были получены, когда свободная неконъюгированная полезная нагрузка MMAF-OMe была комбинированной с PF-384 (Фиг. 2C, D). Таким образом, данные результаты подтвердили наши предыдущие результаты с использованием обычных анализов пролиферации и обеспечили дополнительные информации о временной зависимости синергических эффектов *in vitro*.

Многоклеточные 3D сфериоиды, генерируемые в присутствии внеклеточного матрикса, имеют больше общего с растущими солидными опухолями: в отличие от 2D культур, клетки в 3D условиях пролиферируют с меньшей скоростью и содержат покоящиеся клетки. Для обеспечения биологического понимания эффектов комбинации лекарственного средства в 3D условиях, ответ MDA-468 сфериоидов на обработку 5T4-ADC, MMAF-OMe, PF-384 и паклитакселом был исследован для того, чтобы определить IC50 для каждого агента по отдельности. Комбинации затем оценивали с помощью серийного разведения 5T4-ADC, комбинированного с фиксированными дозами второго агента или в виде взаимных комбинаций двух лекарственных средств. Комбинированные агенты также были включены в тот же эксперимент, что и отдельные агенты, чтобы обеспечить контроль только одного лекарственного средства. Наблюдалось значительное повышение цитотоксичности в 3D сфериоиде для комбинации 5T4-ADC/ PF-384, MMAF-OMe /PF-384 или 5T4-ADC/паклитаксел (фиг. 3 A-F). Аналогичные наблюдения были сделаны для сфериоидов рака легких H-1975, обработанных комбинацией 5T4-ADC/PF-384, MMAF-OMe /PF-384 или 5T4-ADC/PTX (Фиг. 3G-J и данные не показаны).

Пример 10: Влияние PF-384 или паклитаксела на апоптоз и клеточный цикл

Для того, чтобы оценить, происходит ли синергическое ингибирование роста,

индуцированное комбинациями 5T4-ADC и PF-384 или паклитаксела, благодаря апоптозу, была определена активация проапоптического сигнала каспазы 3/7 в клетках H-1975 или MDA 468. 5T4-ADC или PF-384 по отдельности приводили к умеренной активации каспазы 3/7 в обеих клеточных линиях, измеренных через 24 часа после инкубирования (Фиг. 4). Однако, комбинированное лечение показало заметно повышенное индуцирование каспазы 3/7 (фиг. 4A, E). Аналогичные результаты были получены, когда одни и те же клетки обрабатывали MMAF-OMe плюс PF-384, предполагая, что индуцирование апоптоза в комбинации 5T4-ADC/PF-384 механически связана с действием родительской полезной нагрузки MMAF-OMe (Фиг. 4B, F). Анализ иммуноблотта (не показан) для расщепленного PARP также поддерживает индуцирование апоптоза с использованием комбинации 5T4-ADC/PF384 или MMAF-OMe /PF384. Кроме того, повышенная активация каспазы 3/7 также наблюдалась в клетках MDA-468, обработанных 5T4-ADC или MMAF-OMe плюс паклитаксел в течение 48 часов (Фиг. 4C, D), по сравнению с клетки, обработанных только одним агентом. В совокупности эти данные демонстрируют, что антитролиферативные эффекты, наблюдаемые с комбинациями, могут быть объяснены, по меньшей мере, частично, повышенным апоптотическим ответом, опосредуемым каспазой 3/7.

Кроме того, было оценено, может ли модуляция прогрессирования клеточного цикла дать объяснение синергизму между 5T4-ADC и PF-384, агенты, которые, как ожидается, имеют явный эффект на клеточный цикл. Анализ клеточного цикла проводили как на клетках MDA-468, так и на H-1975 после 24 или 36 часов воздействия лекарственного средства в концентрациях на уровне или выше IC50 для пролиферации клеток (Фиг. 5A-C и данные не показаны). Как и ожидалось, PF-384 индуцировал накопление клеток в фазе G0/G1 клеточного цикла с уменьшением доли клеток в фазе G2/M. Данный эффект

наблюдался через 24 и 36 часов после обработки лекарственным средством. В отличие от этого, 5T4-ADC вызывал дозозависимое накопление клеток в фазе G2/M клеточного цикла и совпадающую потерю клеток G0/G1 в течение от 24 до 36 часов после воздействия. Обработка комбинацией 5T4-ADC и PF-384 в результате приводила к 5 исходному накоплению клеток в G1 и почти нормальному проценту клеток в фазе G2/M через 24 часа после воздействия (Фиг. 5 А, В). В отличие от только 5T4-ADC, никакого 10 увеличения пика G2/M не наблюдалось для комбинации в какой-либо момент времени, при этом снижение G2/M было очевидным через 36 часов. Это сопровождалось 15 существенным увеличением суб-G1, предполагая, что более короткая продолжительность G2/M может быть объяснена повышенной гибелью клеток на этой стадии клеточного 20 цикла (данные не показаны). Кроме того, эффекты неконъюгированного MMAF-ОМе в сочетании с 10 или 100 нМ PF-384 на G0/G1 и G2/M, где в целом аналогичны только MMAF-ОМе, по меньшей мере, при исследуемых концентрациях (данные не показаны). В соответствии с уменьшением общего пика G2/M, обнаруженного для комбинации, 25 было обнаружено, что снижение уровней фосфоро-гистона Н3 для клеток, обработанных комбинацией 5T4-ADC/PF-384 в течение 24 или 36 часов, по сравнению с только 5T4-ADC (24 часа, 5T4-ADC+PF-384 (4,9%) по отношению к 5T4-ADC (7,7%); 36 часов, 5T4-ADC+PF-384 (6,2%) по отношению к 5T4-ADC (10,8%)), что может указывать на более быстрый выход клеток, обработанных комбинацией лекарственных средств, из 30 митотически заблокированного состояния (Фиг. 5С).

Пример 11: Комбинированная терапия *in vivo* с использованием 5T4-ADC и PF-384 или паклитакселя

Для того, чтобы определить, можно ли трансфенировать *in vivo* предпочтительное снижение клеточной пролиферации и индуцирование апоптоза с использованием 5T4-25 ADC/PF-384 или 5T4-АОС/паклитаксела *in vitro*, была оценена эффективность соответствующих отдельных агентов и комбинаций в двух ранее охарактеризованных моделях ксенотрансплантата опухоли. Модели MDA-468 тройного отрицательного рака молочной железы и Н-1975 аденоактиномы легких представляют собой 5T4+ опухолевые ксенотрансплантаты с широким диапазоном уровней экспрессии 5T4, как 30 показано с помощью проточной цитометрии и окрашивания ИНС (3). В то время как средства, используемые в этом исследовании, могут приводить к более высокой эффективности при использовании в более высоких дозах, введение клинически значимых доз данных лекарственных средств было направлено на обеспечение лучшей переводимости наших данных в клиническую практику. Для модели рака молочной 35 железы MDA-468, которая обычно является более чувствительной к 5T4-ADC по сравнению с ксенотрансплантатами Н-1975, проводили анализ времени до конечной точки (TTE) до момента отсутствия опухоли (регрессии опухоли). Графики TTE показывают, что все животные, получавшие PF-384 (7,5 мг/кг), все еще содержали 40 опухоли, тогда как группы, получавшие 5T4-ADC (2 мг/кг) и 5T4-ADC/PF-384, достигали регрессии опухолей в ходе исследования (фиг. 6А). Гораздо меньшее время было 45 необходимо для достижения полных регрессий опухолей в комбинации средств против только 5T4-ADC ($p<0,0001$ согласно логарифмическому ранговому критерию), при этом все животные в группе 5T4-ADC/PF-384 становились свободными от опухоли на 36-1 день. Кроме того, значительные различия в средних объемах опухоли наблюдались 50 между отдельными средствами лечения и комбинацией 5T4-ADC/PF-384 на 53-й день после первоначального дозирования ($p<0,0001$ для PF-384 по сравнению с 5T4-ADC/PF-384; $p=0,02$ для 5T4-ADC по сравнению с 5T4-ADC/PF-384 по *t*-критерию) (Фиг. 6 В). Примечательно, что комбинация средств 5T4-ADC/PF-384 имела 10/10 полных ремиссий

(CR) по сравнению с только 3/8 CR для 5T4-ADC по отдельности и никаких CR в группе PF-384 на 53-й день (Фиг. 6В). Процент животных с менее чем 3-кратным увеличением объема опухоли использовался в качестве конечной точки выживаемости для анализа модели Н-1975, которая, как правило, является менее чувствительной к 5T4-ADC, чем MDA-468. Анализ TTE показал статистически значимую задержку в скорости утроения опухоли для группы комбинации по сравнению с 5T4-ADC (3 мг/кг; $p=0,0356$, логарифмический ранговый критерий) или PF-384 по отдельности (7,5 мг/кг, $p<0,0001$, логарифмический ранговый критерий, фиг. 6С). Обработка 5T4-ADC плюс PF384 также в результате приводила к более полному подавлению роста опухоли со статистически значимой разницей в объемах опухолей на 21-й день ($p=0,006$) после начала терапии (Фиг. 6С).

При благоприятных взаимодействиях, наблюдавшихся между 5T4-ADC и таксанами *in vitro*, была исследована потенциальная противоопухолевая активность данной комбинации *in vivo*. Ксенотрансплантаты MDA-468 исследовали с использованием комбинаций 5T4-ADC (2 мг/кг) плюс паклитаксел (22,5 мг/кг). Анализ TTE данных комбинаций показал значительно более короткое время, необходимое для достижения полных регрессий опухолей для комбинационных средств по сравнению с одиночными лекарственными средствами по отдельности (Фиг. 7 А, С). Как показано на Фиг. 7В, монотерапия 5T4-ADC демонстрировала сильную противоопухолевую активность при 2 мг/кг, что приводило к регрессии опухоли у 3 из 8 опухолей на 53-й день, тогда как паклитаксел по отдельности при 10 мг/кг не оказывал заметного влияния на рост опухоли. Группа комбинации 5T4-ADC/PTX продемонстрировала терапевтическое преимущество по сравнению с обработками монотерапией, о чем свидетельствуют опухолевые регрессии в 9 из 10 опухолей и значительная разница в средних объемах опухолей и (*t*-критерий $p=0,037$ для 5T4-ADC/PTX по сравнению с 5T4-ADC; $p<0,0001$ для 5T4-ADC/PTX по сравнению с PTX). 5T4-ADC, комбинированный с 22,5 мг/кг паклитаксела показал значительные долговременные регрессии у 9 из 9 опухолей на 53-й день, тогда как одинарные лечения по отдельности показали более умеренную противоопухолевую активность (3/9 CR для 5T4-ADC, 6/10 CR для PTX; средние объемы опухолей: $p=0,037$ для 5T4-ADC/PTX по сравнению с 5T4-ADC; $p<0,0001$ для 5T4-ADC/PTX по сравнению с PTX) (Фиг. 6Д). Ксенотрансплантаты рака легких Н-1975 были также обработаны аналогичными одиночными агентами (3 мг/кг 5T4-ADC, 10 мг/кг паклитаксел) или комбинированной терапией (фиг. 7). Двойная терапия 5T4-ADC плюс паклитакселом вызывала заметное усиление противоопухолевой активности по сравнению с монотерапевтическими процедурами, о чем свидетельствует значительная задержка в скорости утроения опухоли для группы с комбинацией по сравнению со средствами лечения 5T4-ADC или PTX по отдельности (Фиг. 7А). Более того, средние объемы опухолей были сильно снижены в группе 5T4-ADC/PTX на 46-й день после первоначальной дозировки по сравнению со средствами лечения одиночным лекарственным средством по отдельности (Фиг. 7F; $p<0,0001$, *t*-критерий).

Проводили исследования для включения PDX-модели рака легкого AA37622, модели мутанта *k-ras*, недавно установленной в нашей группе (3, 4). Поразительно, что аналогичная комбинация 5T4-ADC в концентрации 3 мг/кг и паклитаксела в концентрации 22,5 мг/кг приводила к более выраженному подавлению роста опухоли по сравнению с лечением монотерапией ($p<0,001$, для 5T4-ADC/PTX по сравнению с 5T4-ADC, $p<0,0001$, для 5T4-ADC/PTX по сравнению с PTX, двухфакторный ANOVA на 56-й день; Фиг. 7G).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Таблица 1. Раковые клеточные линии

Клеточные линии	Тип	Мутации	
5	TUM622	NSCLC, AA37622 PDX-производное	K-RAS+/-
	NCI-H1975	NSCLC, Аденокарцинома	EGFR+/- (L858R/T790M), PIK3CA+/- (G118D), TP53+/-, CDKN2A+/-
	Calu-6	NSCLC	TP53+/-, KRAS+/-, BRCA2+/-
	NCI-H358	NSCLC, Бронхиолоальвеолярная аденокарцинома	KRAS+/-, FGFR1+/-
10	HCC2429	NSCLC	N.A.
	MDA-MB-435-5T4	Меланома, экссудативный плеврит	BRAF+/- (V600E), TP53+/-, CDKN2A+/-
	MDA-MB-468	Молочной железы, Базальный	HER2-/ER2-/PrgR-; PTEN+/-, RB1del+/-, SMAD4+/-, TP53+/-
	MDAMB-361-DYT2	Молочной железы, Полостной	HER2+/ER2+/PrgR-; 2XPIK3CA+/-, AKT1+/-, EGFR+/-
15	MDA-231	Молочной железы, Базальный	HER2+/ER-/PrgR-; K-RAS+/-, B-RAF+/-, NF2+/-, TP53+/-, CDKN2A+/-
	CAOV-3	Яичника, Аденокарцинома	TP53+/-, EGFR+/- (R255Q), STK11+/-
	TOV-112D	Яичника, злокачественная аденокарцинома; эндометриоидная карцинома	TP53+/-, HER2+
	OV-90	Яичника, Злокачественная папиллярная серозная аденокарцинома	TP53+/-, SMAD4+/-, BRAF+/-, CDKN2A+/-
20	OVCAR-3	Яичника, Аденокарцинома	TP53+/-, PPP2R1A+/-
	SKOV-3	Яичника, Аденокарцинома	PIK3CA+/- (H1047R), TP53+/-, NF1+/-, ATM+/-, APC+/-
	HT-29	Колоректальная аденокарцинома	BRAF+/- (V600E), PIK3CA+/- (P449T), SMAD4+/-, TP53+/-, 2XAPC+/-
	NCI-N87	Карцинома желудка, аденокарцинома, происходящая от метастатического места, печени	SMAD4+/-, TP53+/-, HER2+/-, IL2+/-, PCSK7+/-
25	Raji	NHL Беркитта	MYC+/-, TP53+/-
	Ramos	NHL Беркитта	t(8;14), N.A.

Таблица 2. Комбинации лекарственных средств в клеточных линиях рака легких

Комбинация	TUM622	NCI-H1975	Calu-6	NCI-H358	HCC2429
Aur101+PACLI		0,99	0,26	1,03	0,50
Aur101+DOCET		1,19	0,33	0,77	0,71
Aur101+VINO		0,83	0,61	0,78	0,37
Aur101+CISPL		1,31	0,52	0,63	0,65
Aur101+GEM		1,34	0,82	0,87	1,23
Aur101+CARBO		0,83	0,2	0,95	0,55
Aur101+PEMET		0,71	0,13	0,12	0,07
Aur101+ERLO		0,55	0,46	0,42	0,22
Aur101+PF384		0,60	0,57	0,49	0,26
Aur101+PD901		0,33	0,62	0,48	0,40
MMAF+PACLI		0,88	0,71	0,81	0,67
MMAF+DOCET		0,63	0,77	1,08	0,43
MMAF+VINO		0,72	0,62	0,74	0,97
MMAF+CISPL	0,53	1,00	0,30	0,90	0,78
MMAF+GEM		0,89	0,61	0,95	0,86
MMAF+CARBO		0,84	0,48	1,26	0,48
MMAF+PEMET		0,32	0,11	0,35	0,22
MMAF+ERLO	0,24	0,45	0,25	0,85	0,33
MMAF+PF384	0,60	0,47	0,46	0,37	0,55
MMAF+PD901		0,22	0,3	0,20	0,55

	5T4ADC+PACLI	0,70			
5	5T4ADC+DOCET	0,51			
	5T4ADC+VINO	0,30			
10	5T4ADC+CISPL	0,49			
	5T4ADC+CARBO				
	5T4ADC+GEM	1,32			
15	5T4ADC+ERLO	0,13			
	5T4ADC+PEMET	0,52			
	5T4ADC+PF384	0,45			
20	5T4ADC+PD901	0,38			
	PACLI+PF384	0,83	0,67	0,32	0,54
25	PACLI+GEM	0,84			
	PACLI+MEK	0,92			
	PACLI+PEMET	0,24			
30	DOCET+PF384	0,75			
	VINO+PF384		1,07	0,34	0,29
35	VINO+PACLI		0,61	0,45	0,64

Таблица 3. Комбинации лекарственных средств в клеточных линиях рака молочной железы

Комбинация	MDA468	MDA361-DYT2	MDA-231	MDA435-5T4
Aur101+ADRIA	2,87	2,25	2,32	
Aur101+EPIRUB	2,38	2,07	1,21	
Aur101+GEM	1,81	2,07	1,26	
Aur101+PACLI	1,45	1,43	1,26	
Aur101+DOCET	0,82	1,13	1,37	
Aur101+5FU	0,37	1,03	0,58	
Aur101+MTX	2,49	2,33		
Aur101+PF384	0,58	0,86	0,52	
Aur101+PD901	0,52	0,45	0,41	
MMAF+ADRIA	2,71	1,89	1,51	
MMAF+EPIRUB	3,17	1,96	1,25	
MMAF+GEM	1,78	1,12	1,43	
MMAF+PACLI	0,70	1,35	1,46	
MMAF+DOCET	0,80	1,34	1,45	
MMAF+5FU	0,64	0,71	0,56	
MMAF+MTX	0,64	2,05	1,10	
MMAF+PF384	0,43	0,76	0,54	0,39
MMAF+PD901	0,38	0,42	0,37	0,43
5T4ADC+ADRIA	1,64	0,93		1,69
5T4ADC+EPIRUB	1,36	1,59		0,76

5	5T4ADC+GEM	0,91			
10	5T4ADC+PACLI	0,69	1,18		
15	5T4ADC+DOCET	0,45	1,20		
20	5T4ADC+5FU	0,87	0,78		0,35
25	5T4ADC+MTX	1,13	1,27		
	5T4ADC+PF384	0,51	0,98		0,37
	5T4ADC+PD901	0,71	0,53		0,56
	PACLI+PF384	1,01			
	PACLI+PD901	0,69			
	PACLI+GEM	1,29			
	PACLI+MTX	1,18			
	PACLI+DOCET	0,87			

Таблица 4. Комбинации лекарственных средств в клеточных линиях рака яичников

Комбинация	OV-90	OVCAR-3	SKOV-3	PDXAA0857
Aur101+PF384	0,51	0,41	0,49	0,80
Aur101+GEM	0,54	8,01	0,47	
Aur101+PACLI	0,20	0,95	1,26	
MMAF+PF384	0,60	0,48	0,54	0,65
MMAF+GEM	0,79	3,23	0,76	2,45
MMAF+PACLI	0,25	1,45	1,67	
CALICH+PF384	0,51	2,12	0,82	1,16

5	CALICH+GEM	0,24	0,70	0,37	0,29
	CALICH+PACLI	0,37	0,38	1,21	
	PACLI+PF384		0,16	0,41	

10 **Таблица 5. Комбинации лекарственных средств в клеточных линиях НТ-29 и Н-87**

Комбинация	НТ-29	Н-87
Aur101+PF384	0,55	0,25
Aur101+WYE-132	0,47	0,47

15 В таблице 1 перечислены раковые клеточные линии, используемые в исследовании.

20 Названия клеточных линий, тканевое происхождение, выбранные мутации или молекулярный статус для каждой клеточной линии подсуммированы на основе общедоступных источников.

25 В таблицах 2-5 перечислены усредненные значения комбинационных индексов (CI) для каждой определенной комбинации на уровне ED50. CI интерпретировали следующим образом: очень сильный синергизм (<0,1), сильный синергизм (от 0,1 до 0,3), синергизм (от 0,3 до 0,7), умеренный синергизм (от 0,7 до 0,85), незначительный синергизм (от 0,85 до 0,9), почти аддитивный (от 0,9 до 1,1), незначительный антагонизм (от 1,1 до 1,2) и умеренный антагонизм (от 1,2 до 1,45). Результаты представляют собой среднее значение от, по меньшей мере, трех независимых экспериментов.

(57) Формула изобретения

30 1. Способ лечения рака у субъекта, который включает совместное введение субъекту, нуждающемуся в этом, 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]пирролидин-1-ил]-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамида или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора PI3K-mTOR, выбранного из PF-384 и его фармацевтически приемлемых солей.

35 2. Способ по п. 1, в котором указанный рак представляет собой рак легких.

3. Способ по п. 1, в котором указанный рак представляет собой рак молочной железы.

40 4. Способ по п. 1, в котором указанный 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]пирролидин-1-ил]-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамид и указанный ингибитор PI3K-mTOR вводят последовательно.

45 5. Способ по п. 1, в котором противораковый эффект, достигаемый за счет совместного введения, является большим, чем противораковые эффекты, достигаемые за счет введения указанного 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]пирролидин-1-ил]-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамида и указанного ингибитора PI3K-mTOR по отдельности.

6. Фармацевтическая композиция для лечения рака у млекопитающих, включающая:

терапевтически эффективное количество 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]пирролидин-1-ил}-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамида или его фармацевтически приемлемой соли; терапевтически эффективное количество ингибитора PI3K-mTOR, выбранного из PF 384 и его фармацевтически приемлемых солей; и

5 фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

7. Дозированная форма для лечения рака у млекопитающих, включающая: (а) терапевтически эффективное количество 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}

10 пропил]пирролидин-1-ил}-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамида или его фармацевтически приемлемой соли; (б) терапевтически эффективное количество ингибитора PI3K-mTOR, выбранного из PF-384 и его фармацевтически приемлемых солей; и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

8. Набор для достижения терапевтического эффекта у млекопитающего, где

15 указанный набор включает: (а) 2-метилаланил-N-[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]амино}пропил]

пирролидин-1-ил}-5-метил-1-оксогептан-4-ил]-N-метил-L-валинамид или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или

разбавитель в первой единичной дозированной форме; (б) ингибитор PI3K mTOR,

20 выбранный из PF-384 и его фармацевтически приемлемых солей, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель во второй единичной дозированной форме; и

(с) средство для содержания указанных первой и второй дозированных форм.

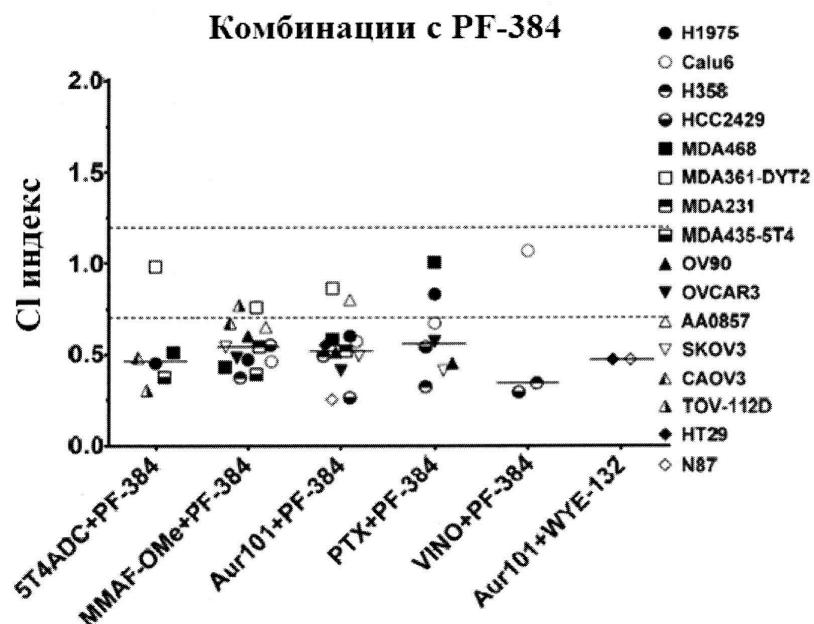
25

30

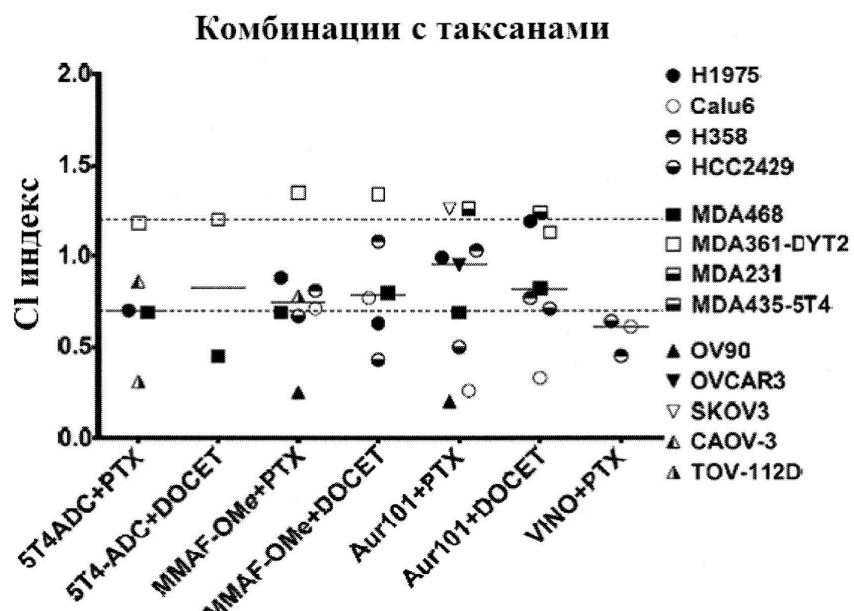
35

40

45

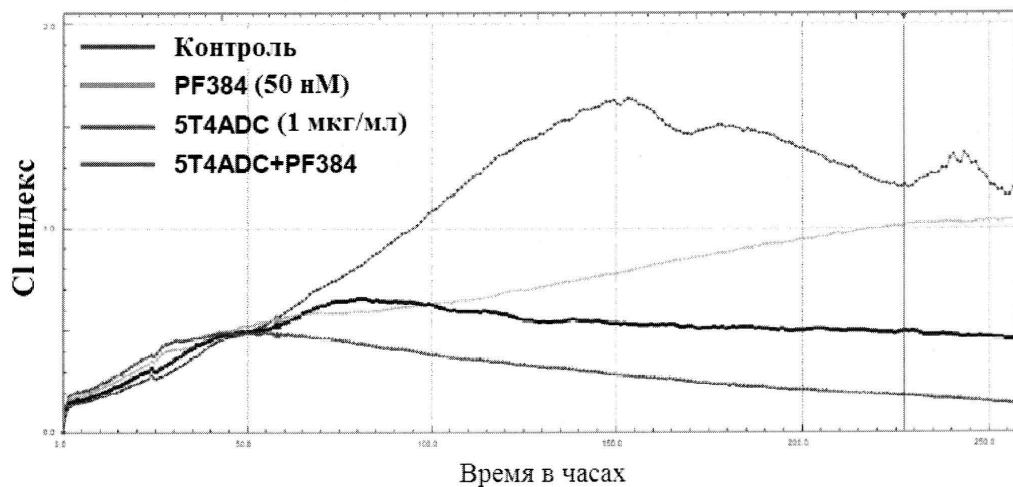


Фиг. 1А



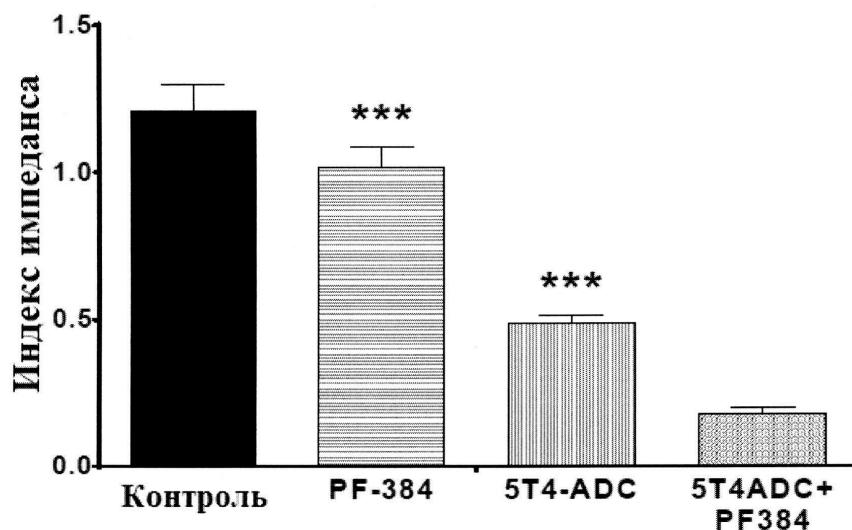
Фиг. 1В

2/20



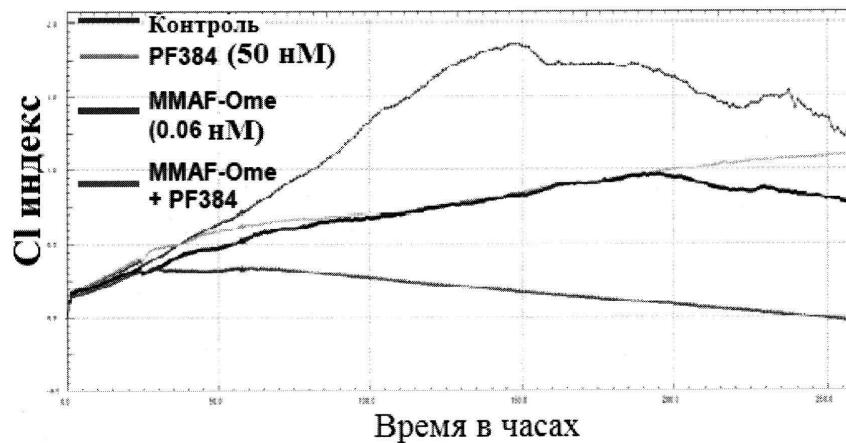
Фиг. 2А

MDA-468, 8 Дней

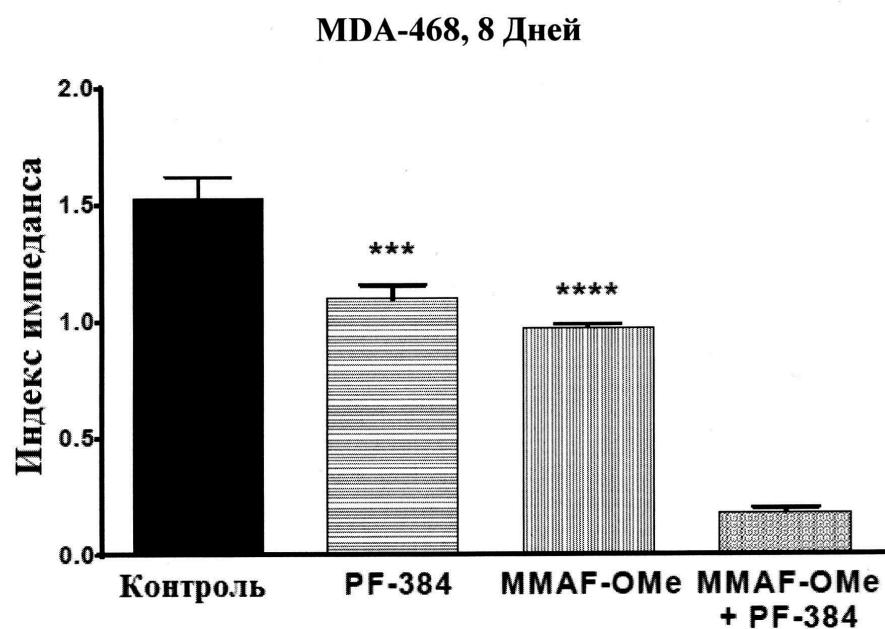


Фиг. 2В

3/20

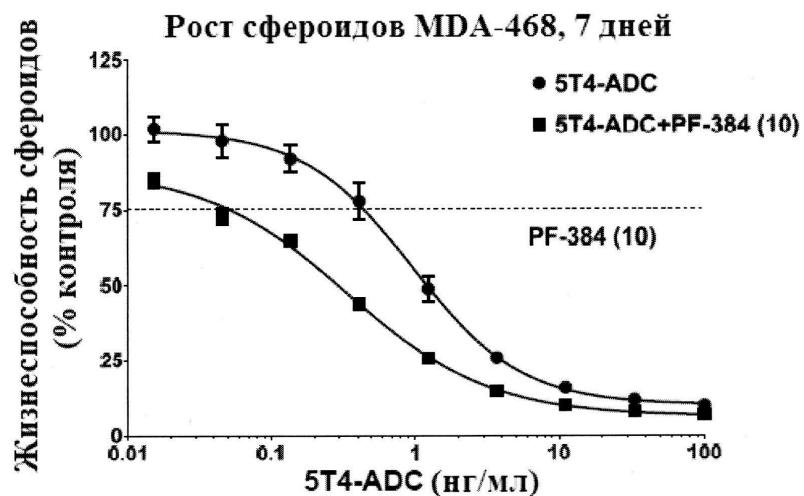


Фиг. 2С (продолжение)

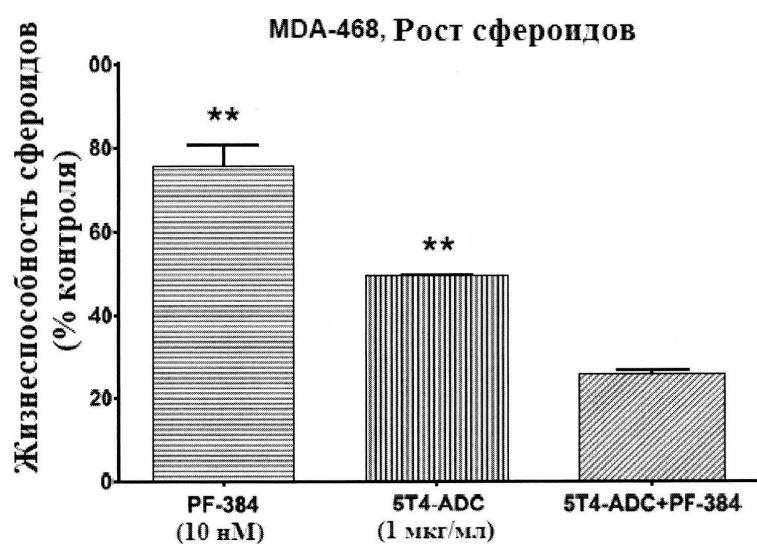


Фиг. 2D

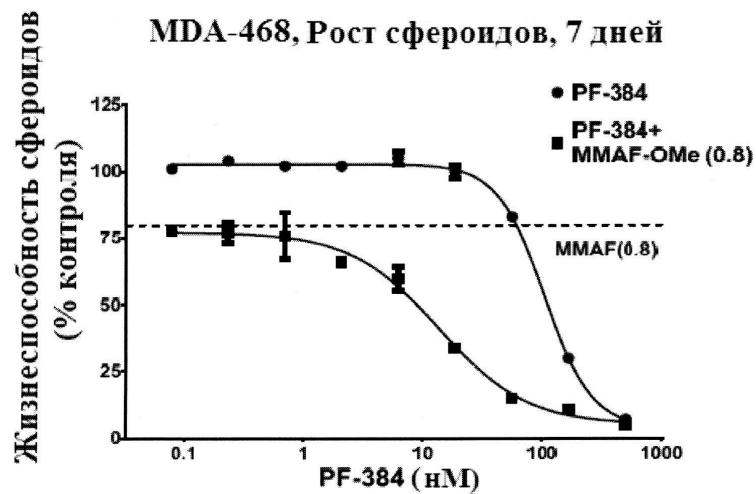
4/20



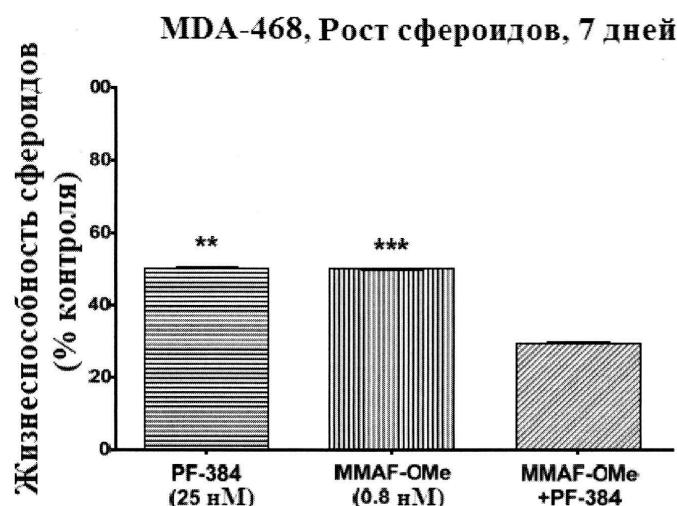
Фиг. 3А



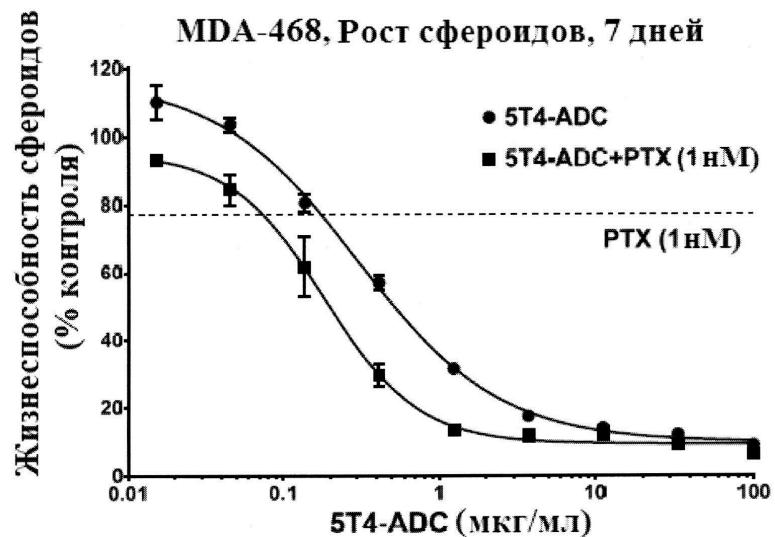
Фиг. 3В



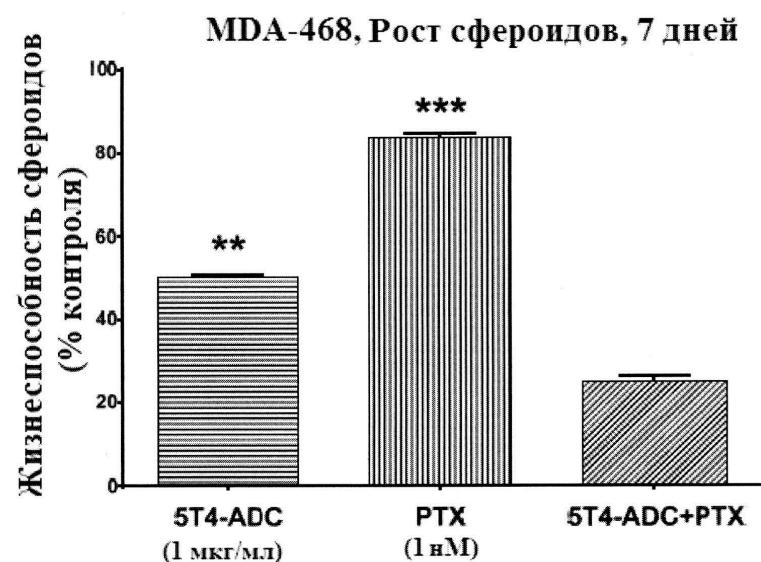
Фиг. 3С (продолжение)



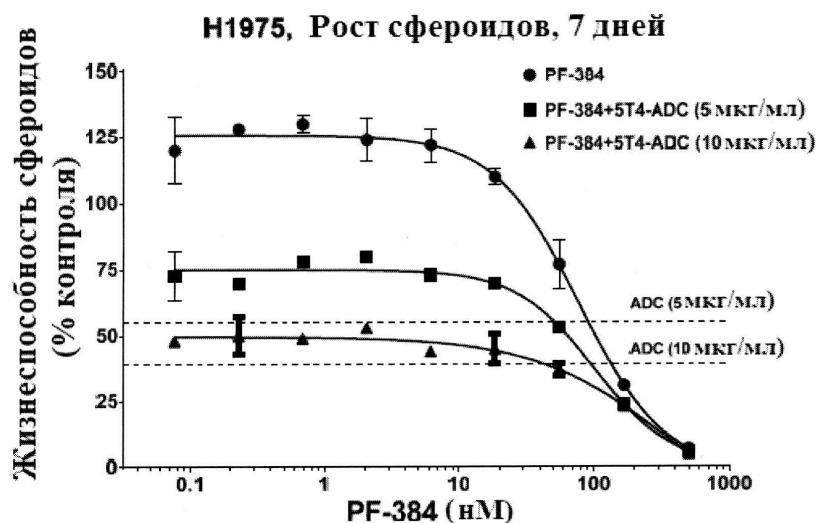
Фиг. 3D



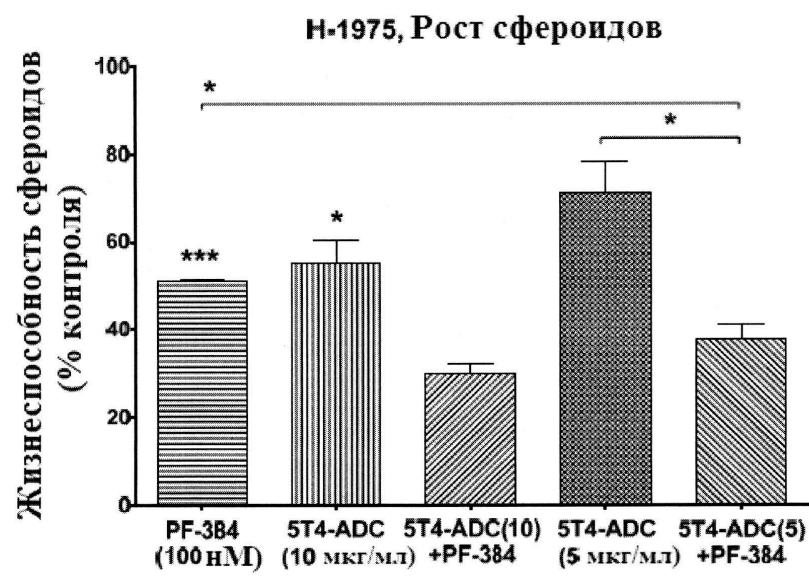
Фиг. 3Е (продолжение)



Фиг. 3F

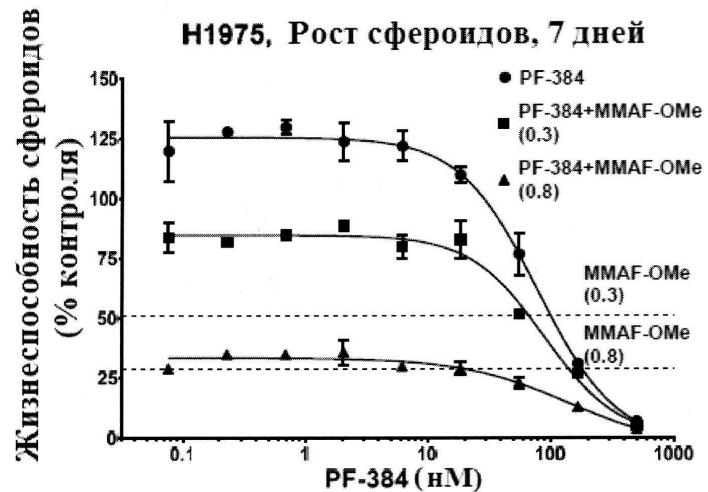


Фиг. 3G (продолжение)

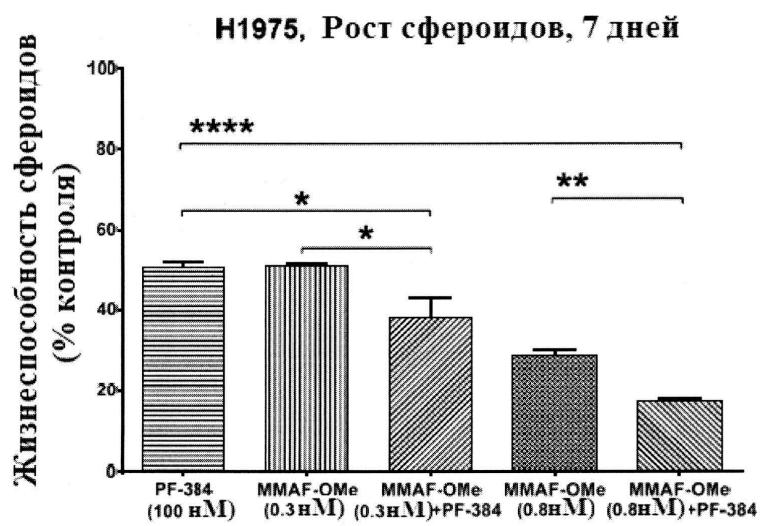


Фиг. 3Н

8/20



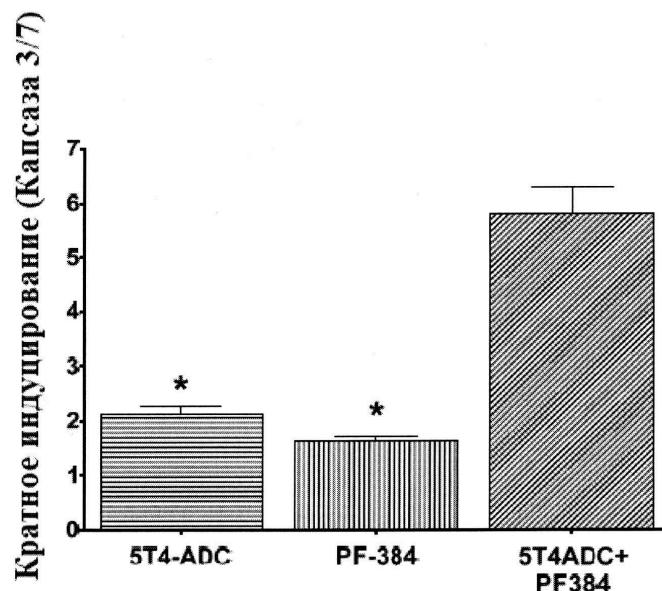
Фиг. 3I (продолжение)



Фиг. 3J

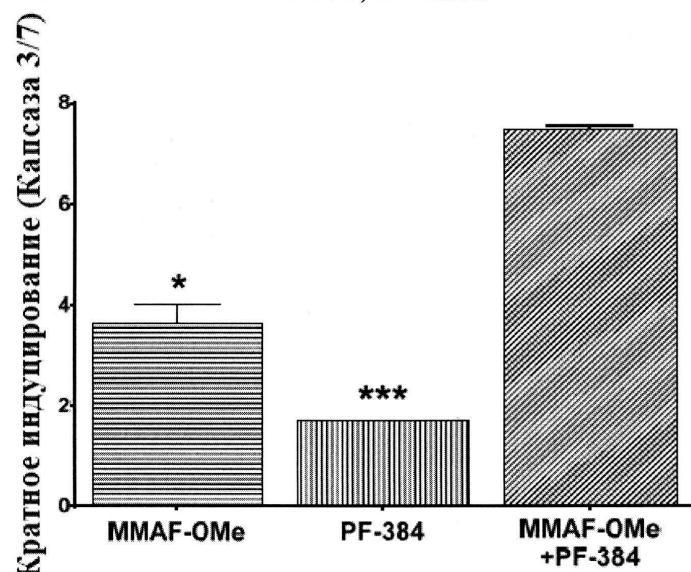
9/20

MDA-468, 24 часа



Фиг. 4А

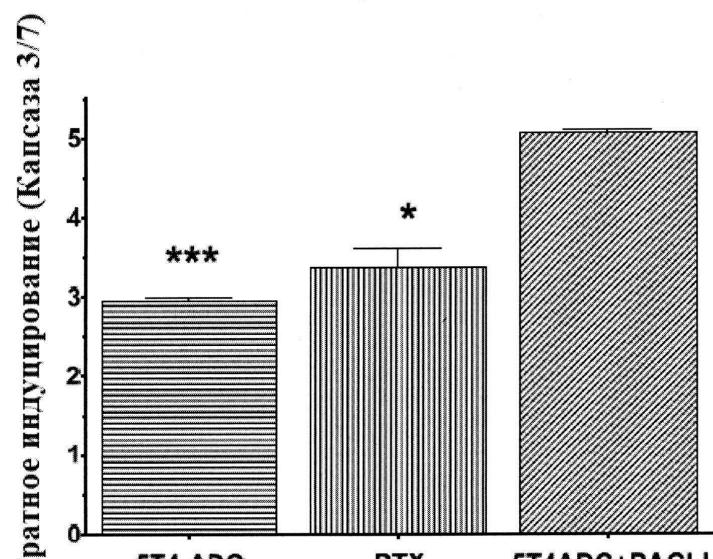
MDA-468, 24 часа



Фиг. 4В

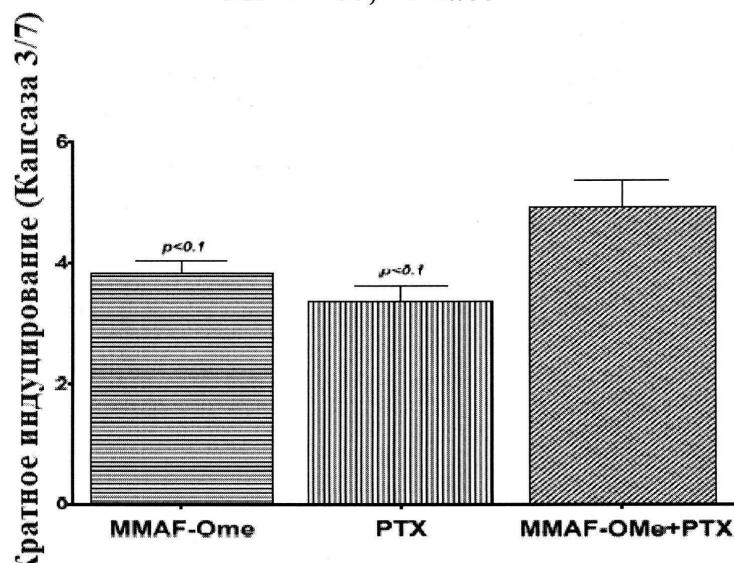
10/20

MDA-468, 48 часов



Фиг. 4С (продолжение)

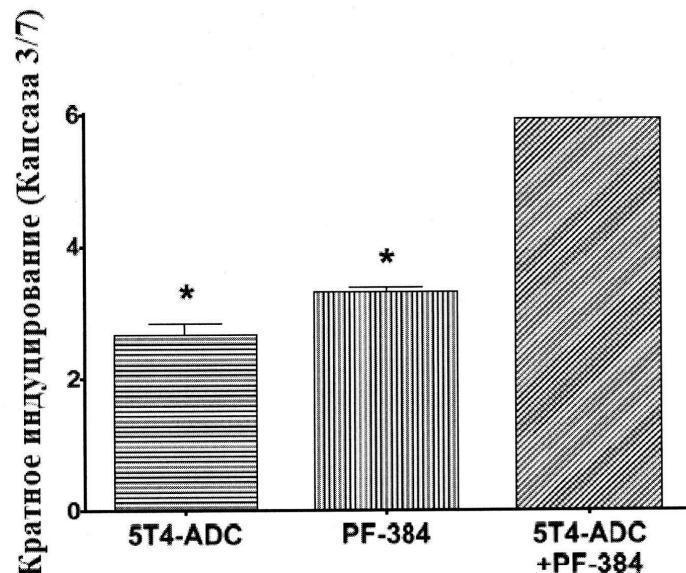
MDA-468, 48 часов



Фиг. 4D

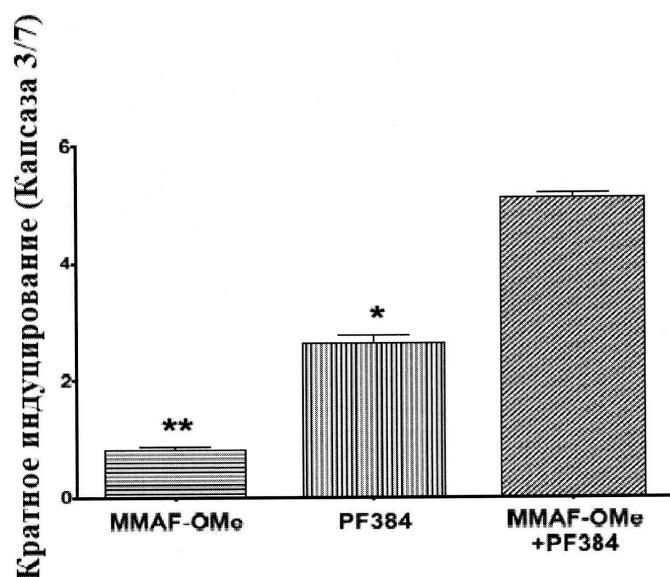
11/20

H-1975, 24 часа



Фиг. 4Е (продолжение)

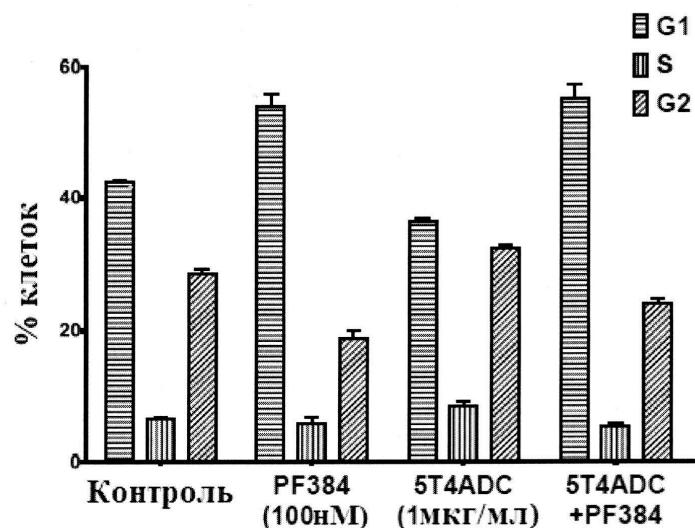
H-1975, 24 часа



Фиг. 4F

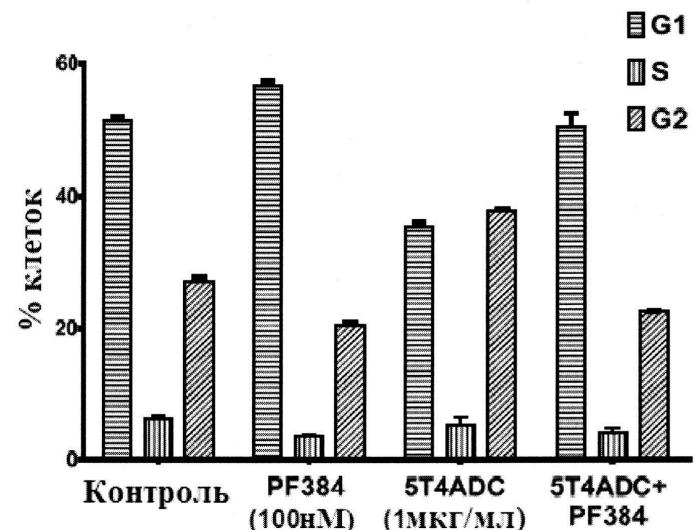
12/20

MDA-468, 24 часа

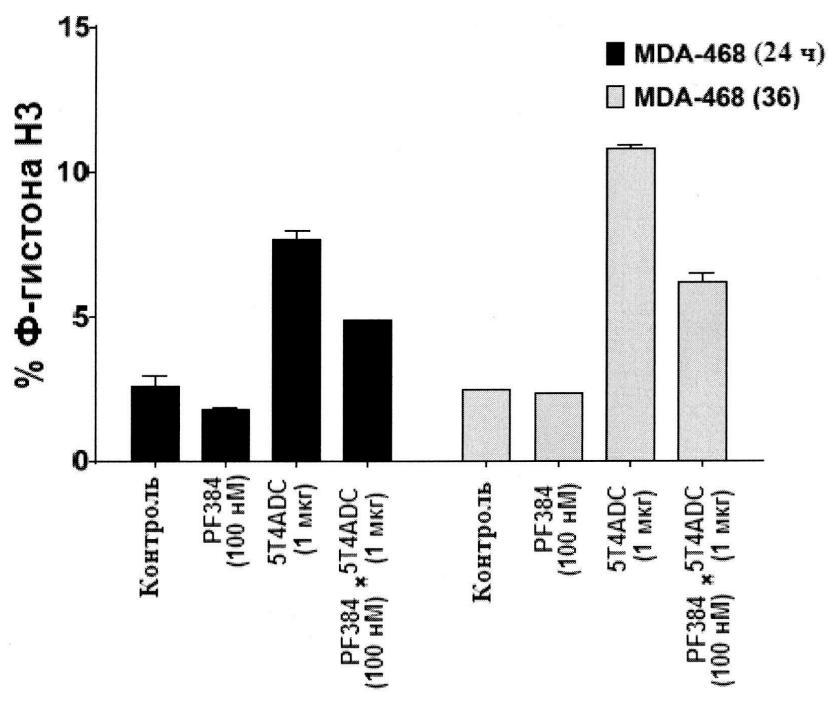


Фиг. 5А

MDA-468, 36 часов

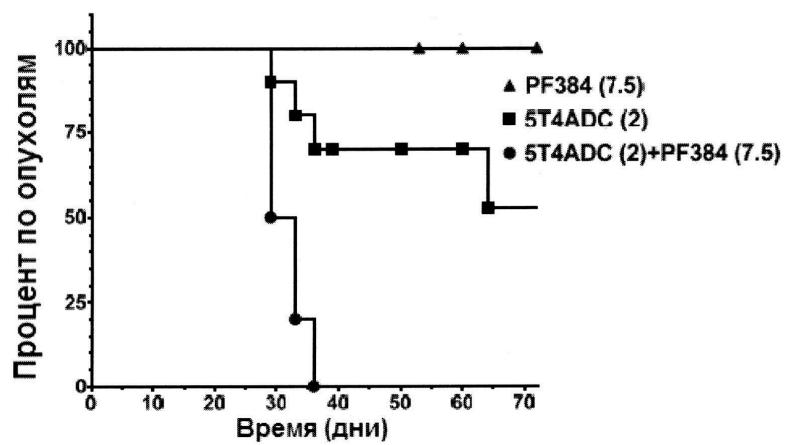


Фиг. 5В

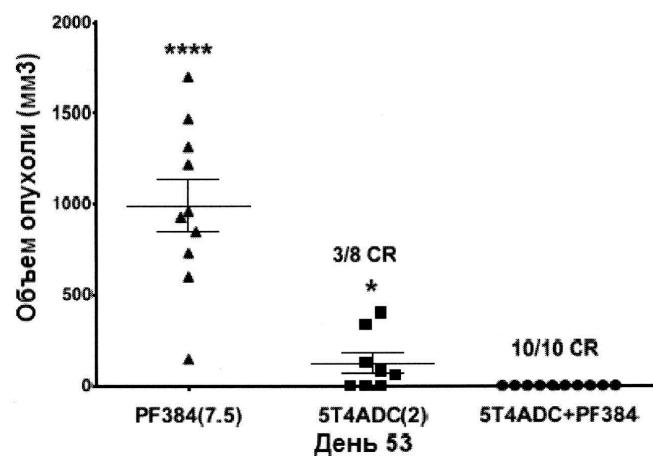
Митотические клетки

Фиг. 5С (продолжение)

14/20

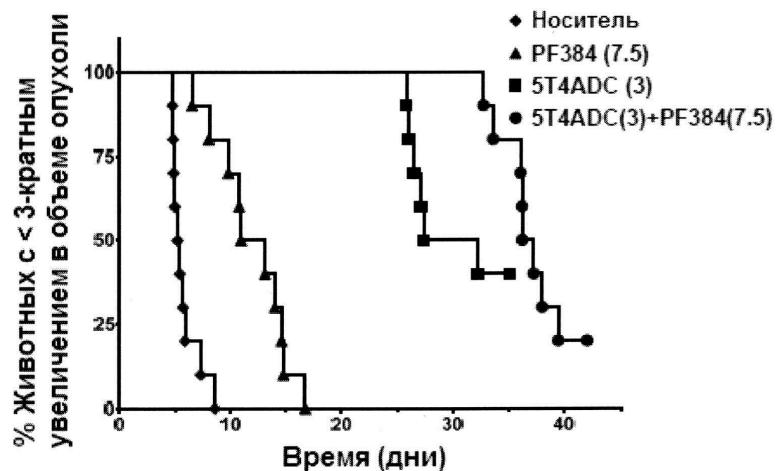
MDA-468

Фиг. 6А

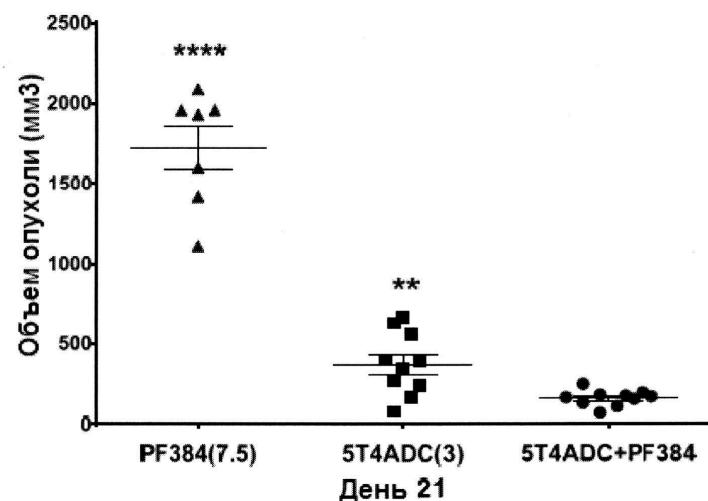
MDA-468, индивидуальные опухоли

Фиг. 6В

15/20

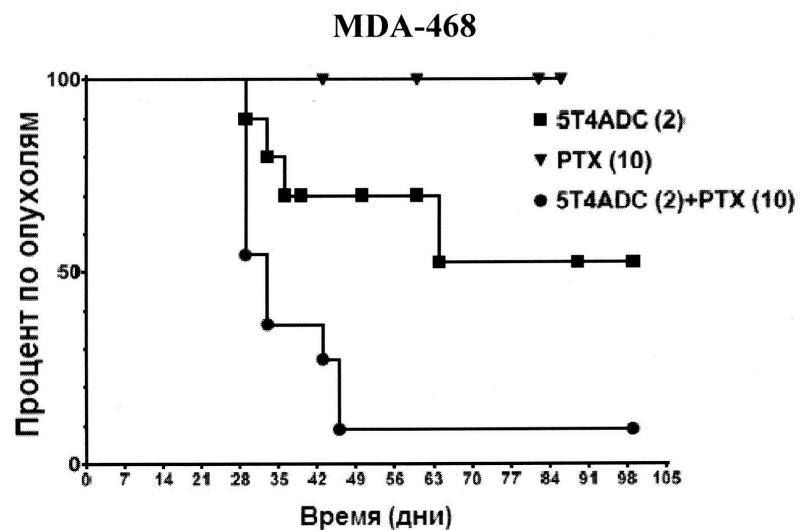
H-1975

Фиг. 6С (продолжение)

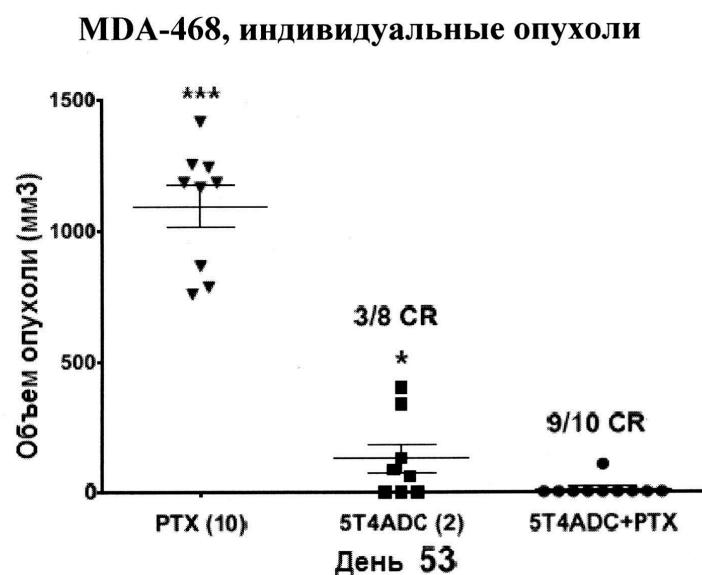
H-1975, индивидуальные опухоли

Фиг. 6D

16/20



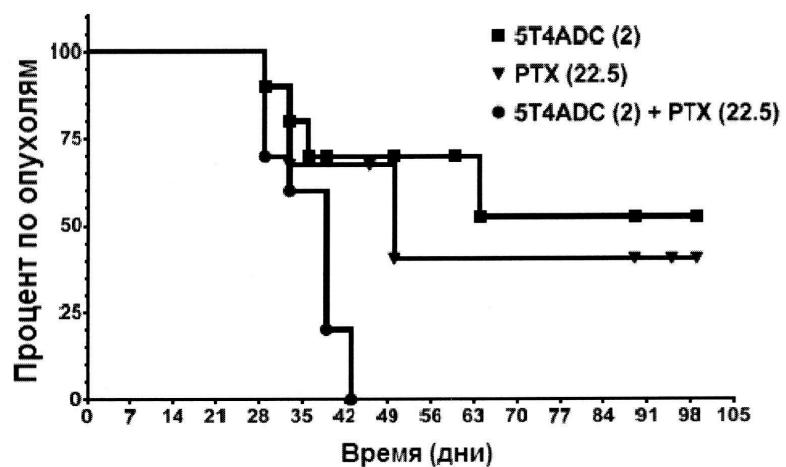
Фиг. 7А



Фиг. 7В

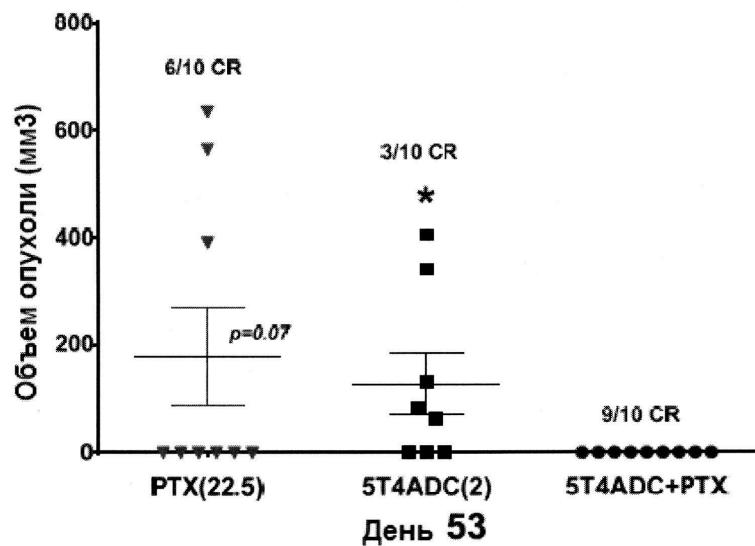
17/20

MDA-468



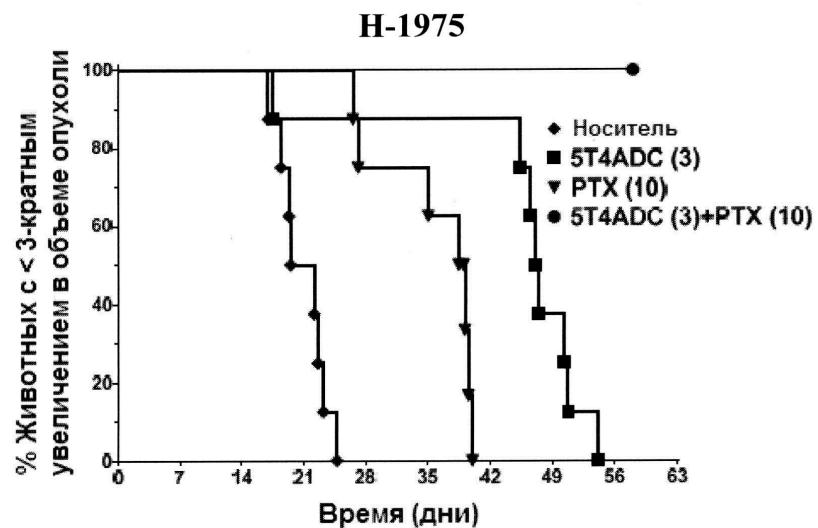
Фиг. 7С (продолжение)

MDA-468, индивидуальные опухоли

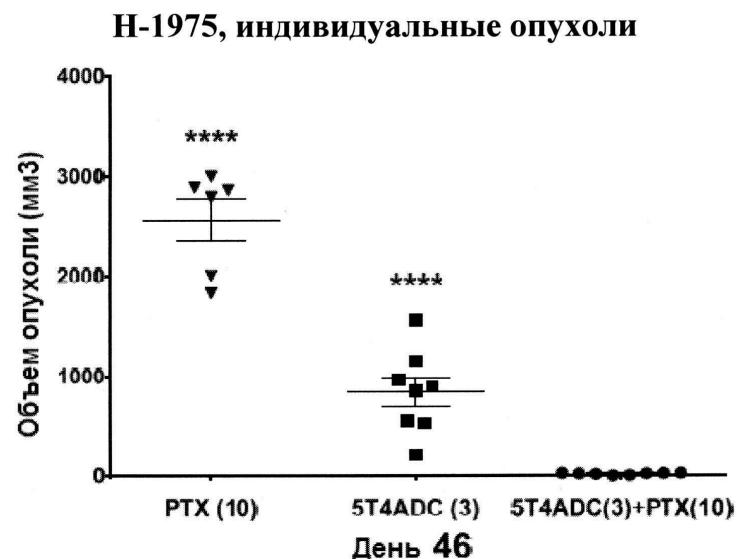


Фиг. 7D

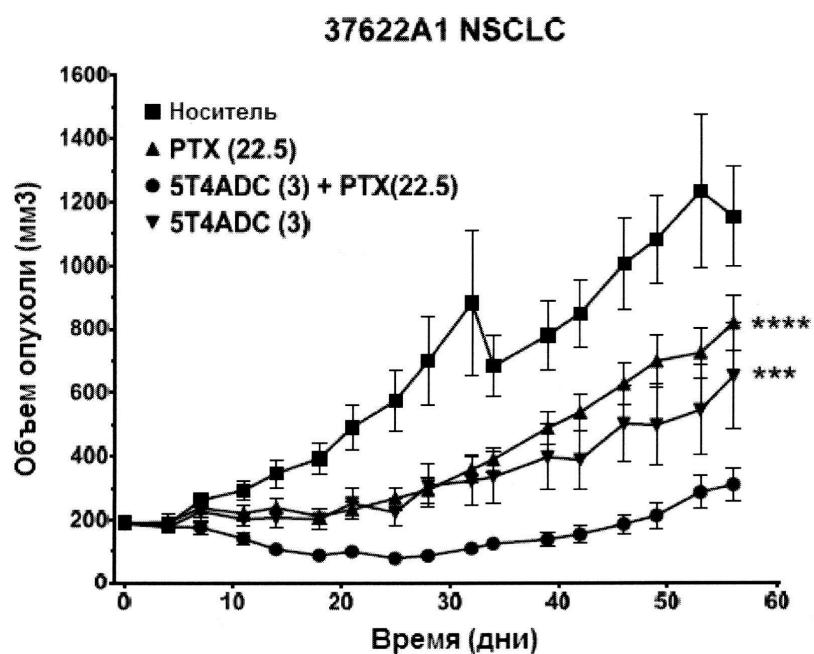
18/20



Фиг. 7Е (продолжение)

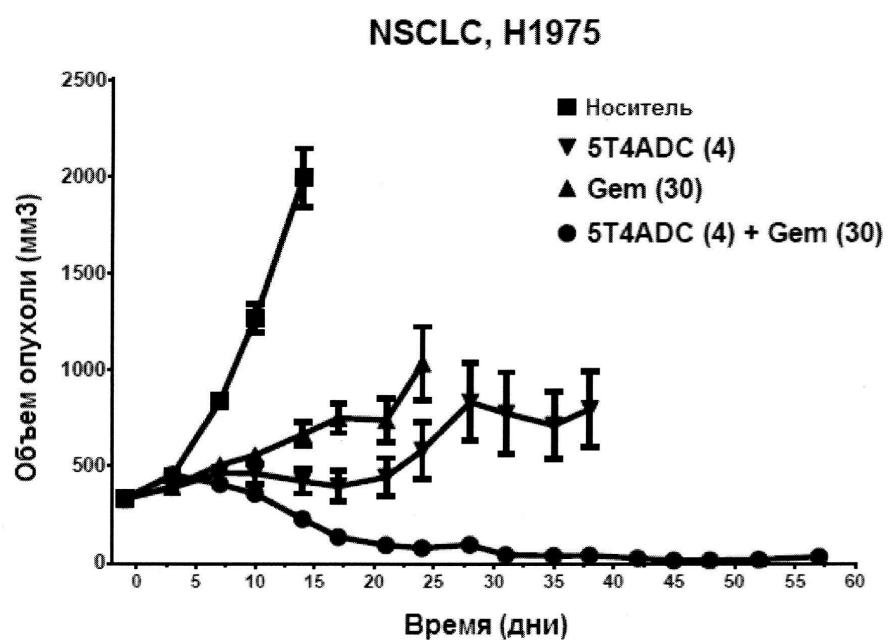


Фиг. 7F



Фиг. 7G (продолжение)

20/20



Фиг. 8