



(51) МПК
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 31/506 (2021.08); *A61K 31/704* (2021.08); *A61K 2300/00* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2019112863, 27.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 27.09.2017

Дата регистрации:
 01.11.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 27.09.2016 US 62/400,606;
 08.12.2016 US 62/497,943

(43) Дата публикации заявки: 02.11.2020 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 01.11.2021 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 29.04.2019

(86) Заявка РСТ:
 US 2017/053589 (27.09.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2018/064092 (05.04.2018)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

БУШЕ, Диана М. (US),
 ХИЛЛАЙЕР, Шон М. (US),
 ЦАИ, Ваньцзун (US),
 ХЭАР, Брайан (US),
 МАРКЛАНД, Уилльям (US),
 НЬЮСОМ, Дэвид А. (US),
 ПЕННИ, Марина С. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ВЕРТЕКС ФАРМАСЮТИКАЛЗ
 ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: WO 2015058067 A1, 23.04.2015. WO
 2015160868 A1, 22.10.2015. US 2011159111 A1,
 30.06.2011. WO 2002020500 A2, 14.03.2002. WO
 2015058031 A1, 23.04.2015. DAVIDSON D. et al.
*Effects of the novel DNA dependent protein
 kinase inhibitor, IC486241, on the DNA damage
 response to doxorubicin and cisplatin in breast
 cancer cells // Investigational new drugs.* (см.
 прод.)

C2
 6
 6
 6
 8
 5
 2

RU

R
 U
 2
 7
 5
 8
 6
 6
 9
 C
 2

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ СОЧЕТАНИЯ ДНК-ПОРАЖАЮЩИХ
 АГЕНТОВ И ИНГИБИТОРОВ ДНК-ПК

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и фармацевтики, а именно к способу лечения пролиферативного расстройства у субъекта, который включает введение субъекту ДНК-поражающего агента и введение субъекту ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) в течение от 8 до 48 часов после введения ДНК-поражающего агента, причем ДНК-поражающим агентом является доксорубициновый агент; пролиферативное

расстройство представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака прямой и ободочной кишки, рака молочной железы, печеночно-клеточной карциномы, рака эндометрия и рака яичников; ингибитором ДНК-ПК является соединение, выбранное из соединения В-1 или В-2, или его фармацевтически приемлемая соль, или сокристалл, содержащий соединение В-1 или его фармацевтически

приемлемую соль или соединение В-2 или его фармацевтически приемлемую соль и образователь сокристалла, выбранный из адипиновой, лимонной, фумаровой, малеиновой, янтарной и бензойной кислоты. Технический

результат заключается в эффективности введения ингибитора ДНК-ПК в течение от 8 до 48 часов после введения ДНК-поражающего агента при лечении пролиферативных заболеваний. 32 з.п. ф-лы, 29 ил., 27 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

- 2012. - Vol. 30. - P. 1736-1742.. EA 008930 B1, 31.08.2007.

R U
2 7 5 8 6 6 9 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/506 (2021.08); A61K 31/704 (2021.08); A61K 2300/00 (2021.08); A61P 35/00 (2021.08)

(21)(22) Application: 2019112863, 27.09.2017

(24) Effective date for property rights:
27.09.2017

Registration date:
01.11.2021

Priority:

(30) Convention priority:
27.09.2016 US 62/400,606;
08.12.2016 US 62/497,943

(43) Application published: 02.11.2020 Bull. № 31

(45) Date of publication: 01.11.2021 Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: 29.04.2019

(86) PCT application:
US 2017/053589 (27.09.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/064092 (05.04.2018)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(19) RU (11)

2 758 669⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 31/506 (2006.01); A61K 31/704 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01)

(72) Inventor(s):

BOUCHER, Diane M. (US),
HILLIER, Shawn M. (US),
TSAI, Wanjung (US),
HARE, Brian (US),
MARKLAND, William (US),
NEWSOME, David A. (US),
PENNY, Marina S. (US)

(73) Proprietor(s):

VERTEX PHARMACEUTICALS
INCORPORATED (US)

R U
2 7 5 8 6 6 9 C 2

(54) METHOD FOR TREATING CANCER USING COMBINATION OF DNA-DAMAGING AGENTS AND DNA-PK INHIBITORS

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine and pharmaceutics, namely, to a method for treating a proliferative disorder in a subject, which includes the administration of a DNA-damaging agent to the subject and the administration of a DNA-dependent protein kinase inhibitor (hereinafter – DNA-PK) to the subject during from 8 to 48 hours after the administration of the DNA-damaging agent, wherein the DNA-damaging agent is a doxorubicin agent; the proliferative disorder is a cancer selected from a group consisting of non-small cell lung cancer, small cell lung

cancer, rectal and colon cancer, breast cancer, hepatic cell carcinoma, endometrial cancer and ovarian cancer; DNA-PK inhibitor is a compound selected from a compound B-1 or B-2, or its pharmaceutically acceptable salt, or a co-crystal containing the compound B-1 or its pharmaceutically acceptable salt or the compound B-2 or its pharmaceutically acceptable salt and a co-crystal formation selected from adipic, citric, fumaric, maleic, succinic and benzoic acid.

EFFECT: effectiveness of the administration of a DNA-PK inhibitor during from 8 to 48 hours after the administration of a DNA-damaging agent in the

R U 2 7 5 8 6 6 9 C 2

treatment of proliferative diseases.

33 cl, 29 dwg, 27 tbl, 10 ex

R U 2 7 5 8 6 6 9 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В этой заявке заявлен приоритет по статье 35 U.S.C. 119(е) к предварительной заявке на патент США №62/400,606, поданной 27 сентября 2016, и предварительной заявке на патент США №62/497,943, поданной 8 декабря 2016, полное содержание которых

5 включено сюда в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рак, как группа, отвечает за приблизительно 13% всех смертей каждый год, где наиболее распространенным является: рак легких (1,4 миллиона смертей), рак желудка (740000 смертей), рак печени (700000 смертей), рак прямой и ободочной кишки (610000

10 смертей) и рак молочной железы (460000 смертей). Три наиболее распространенных детских рака включают лейкоз (34%), опухоли мозга (23%) и лимфомы (12%). Показатели рака у детей увеличивались на 0,6% в год с 1975 по 2002 в США и на 1,1% в год с 1978 до 1997 в Европе. Это делает инвазивный рак основной причиной смерти в развитых странах и второй по значимости причиной смерти в развивающихся странах.

15 Соответственно, существует необходимость в идентификации новых и эффективных терапевтических стратегий, которые смягчат ограничения современных противораковых лекарств.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данные изобретения основаны, по крайней мере, частично на неожиданном открытии, 20 что ингибиторы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК), вводимые через от около 8 до около 48 часов после ДНК-поражающих агентов особенно эффективны при лечении пролиферативных заболеваний.

Следовательно, данное изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в 25 таковом, ДНК-поражающего агента и введение субъекту ингибитора ДНК-ПК в течение от около 8 до около 48 часов после введения ДНК-поражающего агента. Изобретение также относится к ДНК-поражающему агенту для применения в способе лечения пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, ДНК-поражающего агента и введение субъекту ингибитора 30 ДНК-ПК в течение от около 8 до около 48 часов после введения ДНК-поражающего агента. Данное изобретение также относится к применению ингибитора ДНК-ПК для лечения пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, ДНК-поражающего агента и введение субъекту ингибитора 35 ДНК-ПК в течение от около 8 до около 48 часов после введения ДНК-поражающего агента. Данное изобретение также относится к применению ингибитора ДНК-ПК в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, ДНК-поражающего агента и введение субъекту ингибитора 40 ДНК-ПК в течение от около 8 до около 48 часов после введения ДНК-поражающего агента.

В наиболее предпочтительных вариантах ДНК-поражающим агентом является доксорубициновый агент. В данном описании доксорубициновый агент включает доксорубицин в свободной форме, соли доксорубицина, аналоги доксорубицина или любой доксорубициновый агент в липосомах. Не ограничивающими примерами 45 аналогов доксорубицина являются 4'-эпидоксорубицин, 4'-деоксидоксорубицин и 4'-О-метилдоксорубицин, которые описаны в Giuliani et al., Cancer Research, 1980, 40: 4682-87, включенном сюда в качестве ссылки, и 3'-азидодоксорубицин, который описан в Yu et al., Int. J. Mol. Sci., 2012, 13: 3671-3684, включенном сюда в качестве ссылки. В

некоторых вариантах, такой доксорубициновый агент находится в липосомах (например, инкапсулирован в липосомы). Липосома может быть пэгилирована или не пэгилирована. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является соль доксорубицина. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является фармацевтически

- 5 приемлемая соль доксорубицина. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицина. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является свободная форма доксорубицин. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является соль доксорубицина, такая как фармацевтически приемлемая соль доксорубицина в липосомах, которые могут быть пэгилированы или
- 10 не пэгилированы. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является свободная форма доксорубицина в липосомах, которые могут быть пэгилированы или не пэгилированы. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицин в липосомах, которые могут быть пэгилированы или не пэгилированы. В некоторых вариантах, доксорубициновый агент инкапсулирован в
- 15 липосомы, которые могут быть пэгилированы или не пэгилированы. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является липосома с гидрохлоридом доксорубицина. В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицин. В некоторых вариантах, доксорубициновый агент инкапсулирован в липосомы, которые могут быть пэгилированы или не пэгилированы.
- 20 В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является пэгилированный липосомальный доксорубицин, который является пэгилированной инкапсулированной в липосому формой доксорубицина (например, DOXIL® и CAELYX®). В некоторых вариантах, доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицина, инкапсулированный в не пэгилированные липосомы (например, MYOCET®). В
- 25 определенных вариантах пэгилированный липосомальный доксорубицин вводят в дозе от около 14 мг/м² до около 80 мг/м², включительно; в дозе от около 18 мг/м² до около 72 мг/м², включительно; в дозе от около 25 мг/м² до около 55 мг/м², включительно; в дозе от около 30 мг/м² до около 50 мг/м², включительно; или в дозе около 40 мг/м² или
- 30 50 мг/м², включительно.

В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент заключен в липосомы. В определенных вариантах, липосомы, содержащие ДНК-поражающий агент, пэгилированы. В определенных вариантах, липосомы, содержащие ДНК-поражающий агент, не пэгилированы. Не ограничивающие примеры пэгилированных липосомальных носителей могут состоять из холестерина, полностью гидрированного соевого фосфатидилхолина (HSPC) и натриевой соли N-(карбонилметоксиполиэтиленгликоль 2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (MPEG-DSPE). Не ограничивающие примеры не пэгилированных липосомальных носителей могут состоять из фосфатидилхолина и холестерина.

- 40 В альтернативных вариантах, ДНК-поражающий агент включает или его выбирают из химиотерапии. В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент включает или его независимо выбирают из радиомиметического неокарциностатина, платинирующего агента, ингибитора топоизомеразы I, ингибитора топоизомеразы II, антиметаболита, алкилирующего агента, алкилсульфоната или антибиотика, в частности, ДНК-поражающего антибиотика.
- 45

В некоторых других альтернативных вариантах, ДНК-поражающим агентом является платинирующий агент, содержащий или выбранный из Цисплатина, Оксалиплатина, Карбоплатина, Недаплатина, Лобаплатина, Триплатина Тетранитрата, Пикоплатина,

Сатрапатина, Пролиндака или Ароплатина.

В некоторых других альтернативных вариантах, ДНК-поражающим агентом является ингибитор Торо I, содержащий или выбранный из Камптотецина, Топотекана, Иринотекана/SN38, Рубитекана или Белотекана. В некоторых вариантах, ДНК-

5 поражающим агентом является ингибитора топоизомеразы II. В некоторых вариантах, ДНК-поражающим агентом является ингибитор топоизомеразы II, включающий Этопозид, Даунорубицин, Акларубицин, Эпирубицин, Идарубицин, Амрубицин, Пирарубицин, Валрубицин, Зорубицин или Тенипозид. В некоторых вариантах, ДНК-поражающим агентом является антрациклический ингибитор топоизомеразы II. В

10 некоторых вариантах, ДНК-поражающим агентом является даунорубицин, эпирубицин или идарубицин.

В некоторых других альтернативных вариантах, ДНК-поражающим агентом является антиметаболит, содержащий или выбранный из Аминоптерина, Метотрексата, Пеметрекседа, Ралтитрекседа, Пентостатина, Кладрибина, Клофарарабина, Флударарабина, 15 Тиогуанина, Меркаптопурина, Фторурацила, Капецитабина, Тегафура, Кармофура, Флоксуридина, Цитарарабина, Гемцитабина, 6-Меркаптопурина, 5-Фторурацила, Азацитидина или Гидроксимочевины.

В некоторых других альтернативных вариантах, ДНК-поражающим агентом является алкилирующий агент, содержащий или выбранный из Мехлорэтамина, Циклофосфамида, 20 Ифосфамида, Трофосфамида, Хлорамбуцила, Мелфалана, Преднимустина, Бендамустина, Урамустина, Эстрамустина, Кармустина, Ломустина, Семустина, Фотемустина, Нимустина, Ранимустина, Стрептозоцина, Бусульфана, Манносульфана, Треосульфана, Карбоквона, ТиоТЭПА, Триазиквона, Триэтиленмеламина, Прокарбазина, Дакарбазина, Темозоломида, Алтретамина, Митобронитола, 25 Актиномицина, Блеомицина, Митомицина, хлорметинов, нитрозомочевин, триазенов, алкилсульфонатов, Прокарбазина, азиридинов или Пликамицина.

В некоторых других альтернативных вариантах, ДНК-поражающим агентом является ДНК-поражающий антибиотик, содержащий или выбранный из Антрациклинов, Антрацендионов или семейства Streptomyces.

30 В некоторых вариантах, раком является солидная опухоль. В некоторых вариантах, солидным раком является: рак ротовой полости, рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочеполовой системы, рак печени, рак костей, рак нервной системы, гинекологический рак, рак кожи, рак щитовидной железы или рак надпочечников. Говоря по другому, раком является солидная опухоль, выбранная из указанных раков.

35 В некоторых вариантах, лечимым раком является рак ротовой полости, где раком ротовой полости является рак полости рта, рак губ, рак языка, рак рта, рак глотки; рак сердца, где раком сердца является саркома (ангиосаркома, фиброзаркома, рабдомиосаркома, липосаркома), миксома, рабдомиома, фиброма, липома или тератома; рак легких, где раком легких является бронхогенная карцинома (плоскоклеточная или 40 эпидермоидная, недифференцированная мелкоклеточная, недифференцированная крупноклеточная, аденокарцинома), альвеолярная (бронхиоллярная) карцинома, бронхиальная аденома, саркома, лимфома, хондроматозная гамартома или мезотелиома; рак желудочно-кишечного тракта, где раком желудочно-кишечного тракта является рак пищевода (плоскоклеточная карцинома, гортань, аденокарцинома, лейомиосаркома, 45 лимфома), рак желудка (карцинома, лимфома, лейомиосаркома), рак поджелудочной железы (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, виллома), рак тонкой кишки или тонкого кишечника (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома,

гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма), рак толстой кишки или толстого кишечника (аденокарцинома, канальцевая аденома, ворсинчатая аденома, гамартома, лейомиома), рак толстой кишки, рак толстой-прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки или рак прямой кишки; рак мочеполового тракта, где рак мочеполового тракта

В некоторых вариантах, раком является не мелкоклеточный рак легких,

мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак желчных путей, рак

- 45 головы и шеи, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, глиобластома, рак пищевода, рак молочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак эндометрия, рак яичника.

В некоторых вариантах, раком является немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких или трижды негативный рак молочной железы. В некоторых

вариантах, раком является рак яичников или рак эндометрия.

В некоторых вариантах, способ лечения пролиферативного расстройства у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, первой дозы ДНК-поражающего агента и, в промежуток от около 8 до около 48 часов после, введение субъекту

5 соединения, которое ингибитирует ДНК-ПК. Другими словами, способ лечения пролиферативного расстройства у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, первой дозы терапевтически эффективного количества ДНК-поражающего агента и, в промежуток от около 8 до около 48 часов после, введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибитирует ДНК-ПК, 10 т.е. ингибитора ДНК-ПК.

В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК вводят в течение от около 8 до около 30 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК вводят в течение от около 8 до около 20 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 12

15 до около 30 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 20 до около 28 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 10 до около 20 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 12 до около 18 часов после введения ДНК-

20 поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 14 до около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение от около 14 до около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 24 часов после введения

25 ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК вводят в течение около 24 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах,

30 ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 14 часов после введения ДНК-поражающего агента. Согласно наиболее предпочтительному варианту, ДНК-поражающим агентом является доксорубициновый агент.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение В-1. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является фармацевтически приемлемая

35 соль соединения В-1. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение В-2. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является фармацевтически приемлемая соль соединения В-2. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл соединения В-1 и образователя сокристалла (например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая

40 кислота, янтарная кислота или бензойная кислота). В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл фармацевтически приемлемой соли соединения В-1 и образователя сокристалла (например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота или бензойная кислота). В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл

45 соединения В-2 и образователя сокристалла (например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота или бензойная кислота). В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл фармацевтически приемлемой соли соединения В-2 и образователя сокристалла

(например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота или бензойная кислота). В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл соединения B-1 и адипиновая кислота. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл соединения B-2 и адипиновая кислота. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл фармацевтически приемлемой соли соединения B-1 и адипиновая кислота. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл фармацевтически приемлемой соли соединения B-2 и адипиновая кислота. В некоторых вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение B-2 и его вводят около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение B-2 и его вводят около 16 часов после введения доксорубицинового агента. В определенных вариантах, доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицина. В определенных вариантах, доксорубициновым агентом является пэгилированный липосомальный доксорубицин. В некоторых вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл соединения B-2 и адипиновая кислота, и его вводят около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл соединения B-2 и адипиновая кислота, и его вводят около 16 часов после введения доксорубицинового агента. В определенных вариантах, доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицина. В определенных вариантах, доксорубициновым агентом является липосома с гидрохлоридом доксорубицина.

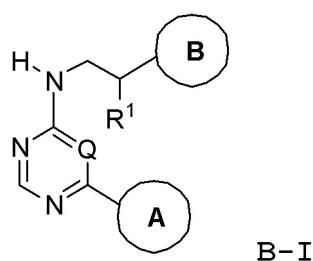
В некоторых вариантах, способ включает введение ингибитора ДНК-ПК и ДНК-поражающего агента более одного цикла, где каждый цикл независимо составляет от около 7 дней до около 28 дней отдельно, и где цикл включает введение ДНК-поражающего агента однократно в День 1, и введение ингибитора ДНК-ПК однократно вплоть до 5 последовательных раз, где каждый последующий период независимо составляет от около 8 часов до около 32 часов раздельно. В некоторых вариантах применяют вплоть до десяти циклов. В некоторых вариантах применяют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 циклов. В некоторых вариантах применяют 1-8 циклов. В некоторых вариантах применяют 2-8 циклов. В некоторых вариантах применяют 1-6 циклов. В некоторых вариантах применяют 2-6 циклов. В некоторых вариантах каждый цикл составляет около 7, 14, 21, 28 или 35 дней. В некоторых вариантах, каждый цикл составляет от около 1 до около 6 месяцев. В некоторых вариантах, каждый цикл составляет около 21 дня. В некоторых вариантах, каждый цикл составляет около 28 дней. Как понятно специалисту в данной области техники, возможно, что имеется задержка между началом последующего в случаях гематогенных или других определяющих параметров. В таких случаях, следующий цикл может не начинаться до, например, 5 или 6 недели от начала предыдущего цикла. В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК и ДНК-поражающий агент вводят в течение, по крайней мере, 2 циклов, и где каждый цикл составляет около 28 дней. В некоторых вариантах, каждый последующий период составляет от около 20 до около 28 часов. В некоторых вариантах, каждый последующий период составляет около 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 часов. В некоторых вариантах, каждый последующий период составляет около 24 часов. В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК вводят в течение 3, 4 или 5 последующих периодов на цикл, каждый из последующих периодов составляет около 24 часов. В определенных вариантах, время между каждый последующим периодом отличается от времени между другими последующими периодами. Например, первый последующий период может составлять 22 часа от первого введения, второй может составлять 24

часа от первого и третий последующий период может составлять 23 часа от второго. В некоторых вариантах, применяют вплоть до шести 28-дневных циклов, в которых ДНК-поражающий агент вводят в первый день и ингибитор ДНК-ПК вводят в дни 2-4 для каждого 28-дневного цикла. Например, первое введение ингибитора ДНК-ПК

5 проводят от около 14 до около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента, второе введение ингибитора ДНК-ПК проводят 24 часа от первого введения, третье введение ингибитора ДНК-ПК проводят 24 часа от второго введения (т.е., 3 последовательных периода применяют для введения ингибитора ДНК-ПК). В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК и ДНК-поражающий агент вводят в 10 течение, по крайней мере, 2 циклов, и где каждый цикл составляет 28 дней, и где ДНК-поражающий агент вводят в День 1, и ингибитор ДНК-ПК вводят в Дни 2, 3 и 4 цикла. В определенных вариантах, способ включает введение ингибитора ДНК-ПК и ДНК-поражающего агента в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 циклов.

15 В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК вводят один раз, два раза или три раза в сутки.

В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК представлен формулой (B-I):



или его фармацевтически приемлемой солью,

25 где:

Q является N или CH;

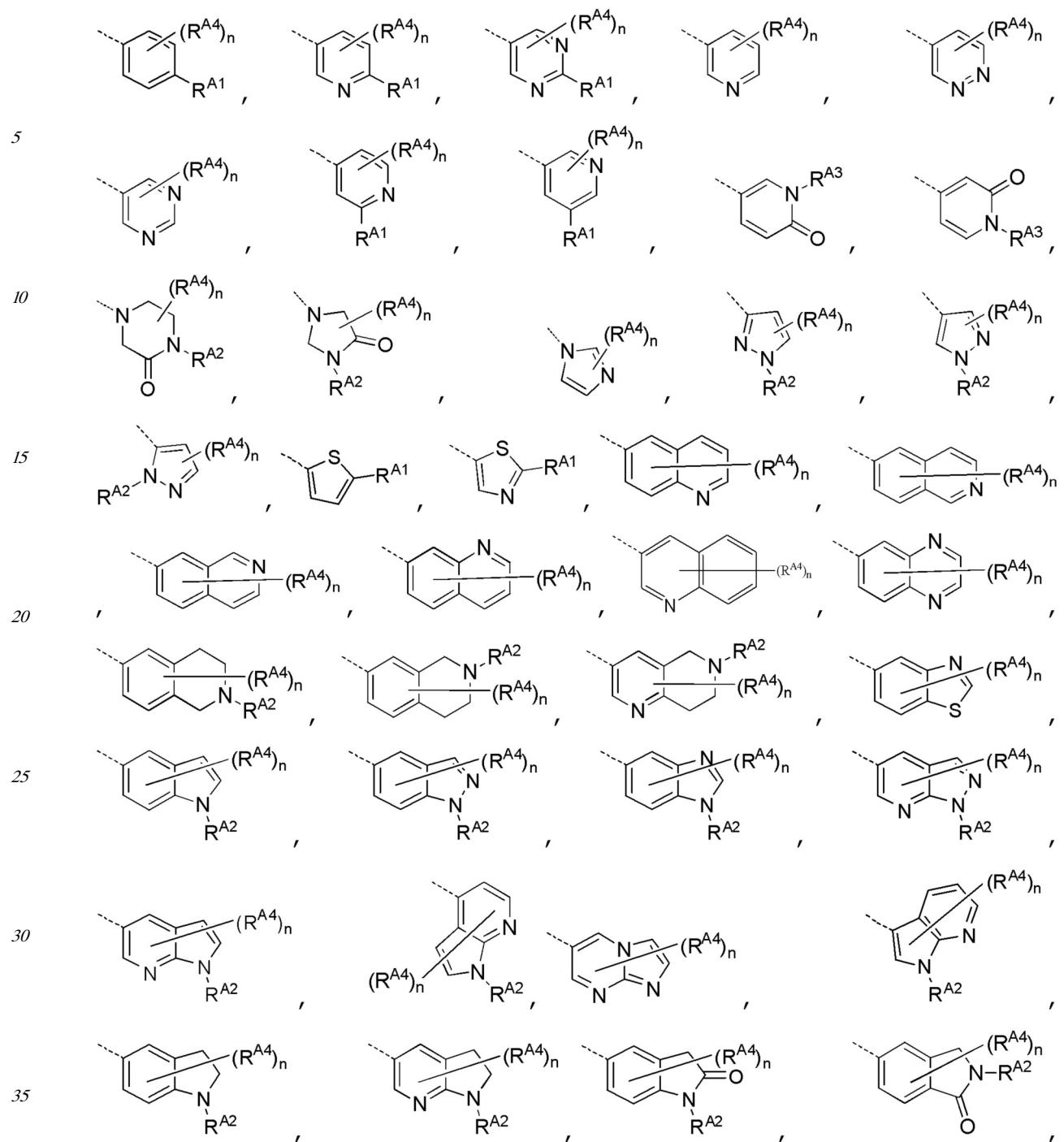
30 R¹ является водородом, CH₃ или CH₂CH₃, или R¹ и атом углерода, к которому он присоединен, образуют C=CH₂ группу;

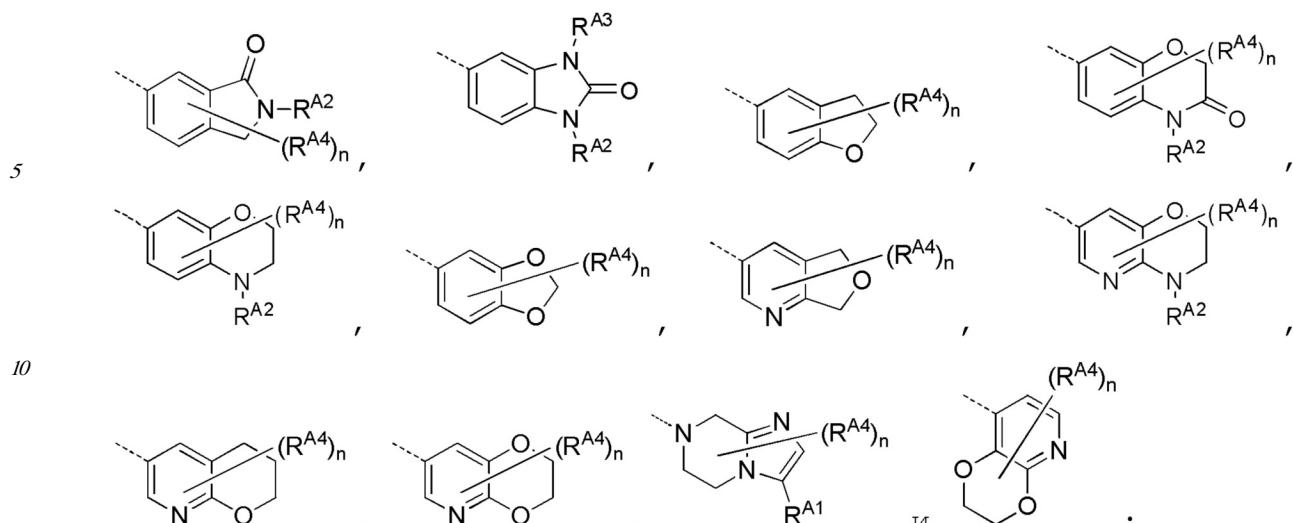
Кольцом А является система колец, выбранная из группы, состоящей из:

35

40

45





15 R^{A1} является водородом, галогеном, C_{1-4} алкилом, C_{0-4} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-4} алкил- OR^{A1a} , C_{0-4} алкил- SR^{A1a} , C_{0-4} алкил- $C(O)N(R^{A1a})_2$, C_{0-4} алкил-CN, C_{0-4} алкил- $S(O)-C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $S(O)_2-C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $C(O)OR^{A1b}$, C_{0-4} алкил- $C(O)C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})C(O)R^{A1a}$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})S(O)_2R^{A1a}$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1a})_2$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})(3-6\text{-членным циклоалкилом})$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})(4-6\text{-членным гетероцикликом})$, $N(R^{A1b})C_{2-4}$ алкил- $N(R^{A1a})_2$, $N(R^{A1b})C_{2-4}$ алкил- OR^{A1a} , $N(R^{A1b})C_{1-4}$ алкил- $(5-10\text{-членным гетероарилом})$, $N(R^{A1b})C_{1-4}$ алкил- $(4-6\text{-членным гетероцикликом})$, $N(R^{A1b})C_{2-4}$ алкил- $N(R^{A1b})C(O)R^{A1a}$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})C(O)C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})C(O)OC_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- (фенилом) , C_{0-4} алкил- $(3-10\text{-членным гетероцикликом})$, C_{0-4} алкил- $C(O)-(4-6\text{-членным гетероцикликом})$, C_{0-4} алкил- $O-C_{0-4}$ алкил- $(4-6\text{-членным гетероцикликом})$, C_{0-4} алкил- $(5-6\text{-членным гетероарилом})$, C_{0-4} алкил- $C(O)-(5-6\text{-членным гетероарилом})$, C_{0-4} алкил- $O-C_{0-4}$ алкил- $(5-6\text{-членным гетероарилом})$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1a})(4-6\text{-членным гетероцикликом})$ или C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})(5-6\text{-членным гетероарилом})$, где каждый из указанных R^{A1} гетероцикликолов является кольцевой системой, выбранной из азиридинила, оксетанила, тетрагидропирана, тетрагидрофуранила, диоксанила, диоксоланила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонаила, пирролидиндионила, морфолинила, пиперидинила, пиперазинила, пиперазинонаила, тетрагидротиофендиоксидила, 1,1-диоксотиетанила, 2-окса-6-азаспиро[3,4]октанила и изоиндолинонаила, где каждый из указанных R^{A1} гетероарилов является системой колец, выбранной из фуранила, тиофенила, имидазолила, бензоимидазолила, оксазолила, оксадиазолила, тиазолила, пиразолила, тиадиазолила, пиридинила, пиридинила, пиразинила, триазолила и тетразолила, и где каждая из указанных R^{A1} алкильных, циклоалкильных, фенильных, гетероциклических и гетероарильных групп необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз C_{1-2} алкильной группой, C_{3-6} циклоалкильной группой, фенильной группой, бензильной группой, алкенил- C_{0-2} алкильной группой, алкинил- C_{0-2} алкильной группой, вплоть до двух раз,

C_{0-2} алкил- OR^{A1b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A1b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, $S(O)_2C_{1-4}$ алкильной группой, $C(O)R^{A1b}$ группой, $C(O)OR^{A1b}$ группой, $C(O)N(R^{A1b})_2$ группой, $-CN$ группой или C_{4-6} гетероциклической системой колец, выбранной из

⁵ оксетанила, тетрагидрофуанила, тетрагидропирана, пиперидинила и морфолинила; каждый R^{A1a} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{3-6} циклоалкилом, C_{4-6} гетероцикликом, выбранном из оксетанила, тетрагидрофуанила, тетрагидропирана, пирролидинила и пиперидинила, C_{5-6} гетероарилом, выбранным из имидазолила,

¹⁰ триазолила, тетразолила, пиразолила, тиофенила, тиазолила, пиридинила, пиридинилы и пиразинила, или два R^{A1a} и атом азота между ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила, пиперидинонила, тетрагидропиридинила,

¹⁵ пиперазинила и морфолинила, где каждая из указанных R^{A1a} алкильных, циклоалкильных, гетероциклических и гетероарильных групп необязательно замещены вплоть до трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами 2H, вплоть до двух раз C_{1-2} алкильными группами, C_{3-6} циклоалкильной группой, вплоть до двух раз C_{0-2} алкил- OR^{A1b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A1b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, $C(O)R^{A1b}$ группой, $C(O)OR^{A1b}$ группой, $C(O)N(R^{A1b})_2$ группой или $-CN$ группой;

²⁰ каждый R^{A1b} независимо является водородом, C_{1-2} алкилом или C_{3-4} циклоалкилом; R^{A2} является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{0-4} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-2} алкил-(4-6-членный)гетероцикликом, C_{2-4} алкил- OR^{A2a} , C_{0-2} алкил- $C(O)N(R^{A2a})_2$, C_{0-2} алкил- $S(O)_2C_{1-4}$ алкилом, C_{0-2} алкил- $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, C_{0-2} алкил- $C(O)-(4-6\text{-членный})$ гетероцикликом, где каждый из указанных гетероциклических групп выбирают из оксетанила, тетрагидропирана, тетрагидрофуанила, диоксанила, диоксоланила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пирролидинонила, морфолинила, пиперидинила, пиперазинила, пиперазинонила и 1,1-диоксотиетанила, и каждая из указанных R^{A2} групп, за исключением водорода, необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, C_{3-6} циклоалкильной группой, R^{A2b} алкинил- C_{0-2} алкильной группой, алкинил- C_{0-2} алкильной группой, вплоть до двух раз, OR^{A2b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A2b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, $S(O)_2C_{1-4}$ алкильной группой, $C(O)R^{A2b}$ группой, $C(O)OR^{A2b}$ группой, $C(O)N(R^{A2b})_2$ группой или $-CN$ группой;

²⁵ R^{A2b} каждый R^{A2a} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{5-6} гетероарилом, выбранным из имидазолила, триазолила, тетразолила, пиразолила, тиофенила, тиазолила, пиридинила, пиридинила и пиразинила, или два R^{A2a} и атом азота между ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила, пиперидинонила, тетрагидропиридинила, пиперазинила и морфолинила;

³⁰ каждый R^{A2b} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом или C_{3-4} циклоалкилом;

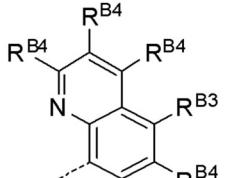
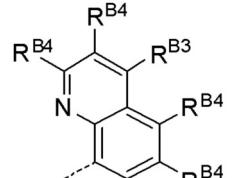
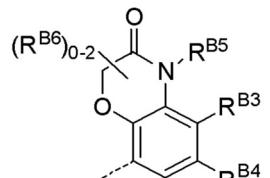
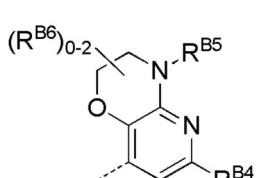
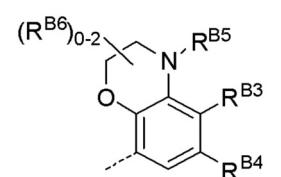
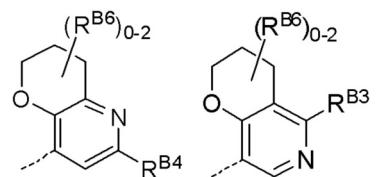
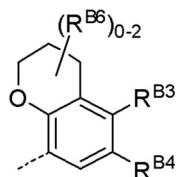
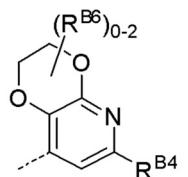
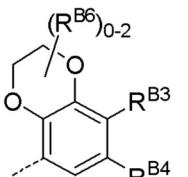
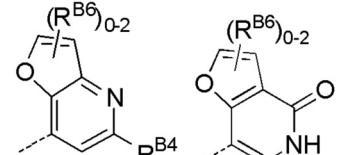
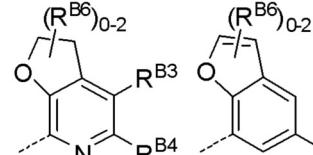
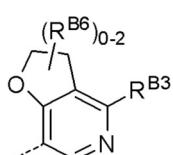
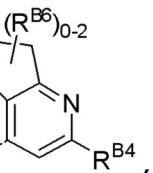
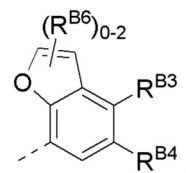
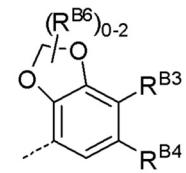
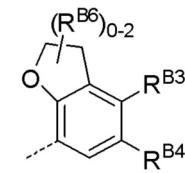
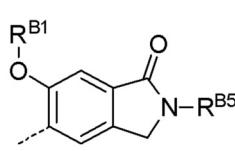
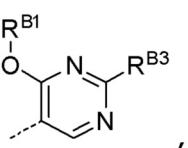
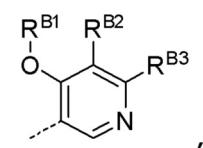
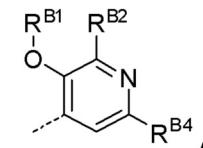
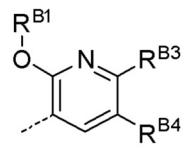
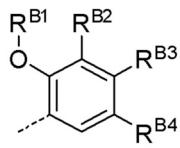
R^{A3} является водородом или C_{1-2} алкилом;

каждый R^{A4} независимо является дейтерием, галогеном, CN, C_{1-4} алкилом или

5 OC_{1-4} алкилом, где каждый R^{A4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом, или два R^{A4} вместе с промежуточным насыщенным атомом углерода образуют спиро-связанное циклопропильное или циклобутильное кольцо;

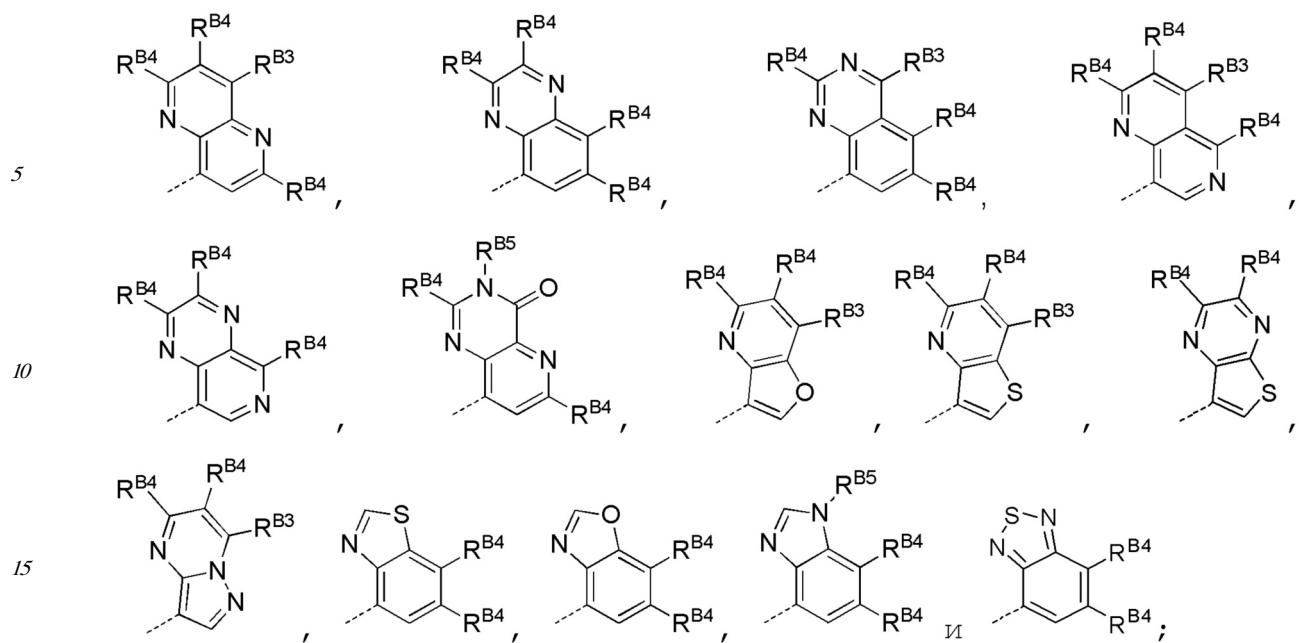
10 n равно 0-3;

Кольцом В является система колец, выбранная из группы, состоящей из:



40

45



R^{B1} является водородом, C_{1-4} алкилом, $(CH_2)_{0-1}C_{3-6}$ циклоалкилом, $C(O)C_{1-2}$ алкилом, $(CH_2)_{0-1}$ -(4-6-членным)гетероциклическим кольцом, где указанное гетероциклическое 20 кольцо выбирают из оксетанила, тетрагидрофуанила, тетрагидропирана, диоксанила, диоксоланила и пирролидинонила, или $(CH_2)_{1-2}$ -(5-6-членным)гетероарильным кольцом, где указанное гетероарильное кольцо выбирают из пиридинила, имидазолила и 25 пиразолила, и где каждая из указанных R^{B1} алкильных, циклоалкильных, фенильных, бензильных, гетероциклических и гетероарильных групп необязательно замещена вплоть до 3 раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, двумя не 30 геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом;

R^{B2} является водородом, C_{1-4} алкилом или OC_{1-4} алкилом;

30 каждый R^{B3} независимо является водородом, галогеном, C_{1-4} алкилом, C_{2-4} алкенилом, C_{2-4} алкинилом, CN , $C(O)H$, $C(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, $C(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом, $C(O)NH(CH_2)_{0-1}C_{3-6}$ циклоалкилом, $C(O)NHCH_2$ оксетанилом, $C(O)NHCH_2$ тетрагидрофуанилом, $C(O)NHCH_2$ тетрагидропираном, $C(O)NH$ фенилом, 35 $C(O)NH$ бензилом, $C(O)NHOH$, $C(O)NHOC_{1-4}$ алкилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}C_{3-6}$ циклоалкилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}$ оксетанилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}$ тетрагидрофуанилом, $C(O)NHO$ $(CH_2)_{0-1}$ тетрагидропираном, $C(O)NHO$ фенилом, $C(O)NHO$ бензилом, NH_2 , $NHC(O)C_{1-4}$ алкилом, OC_{1-4} алкилом, SC_{1-4} алкилом, $S(O)C_{1-4}$ алкилом или 5-членной 40 гетероарильной системой колец, выбранной из фуанила, тиофенила, имидазолила, пиррола, пиразолила и оксадиазолила, где каждая R^{B3} группа, за исключение водорода или галогена, необязательно замещена Cl, вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами, вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом, одним 45 NH_2 , одним NHC_{1-2} алкилом, одним $NHC(O)C_{1-2}$ алкилом или одним $N(C_{1-2}$ алкилом)₂;

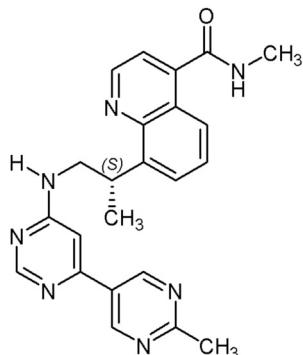
каждый R^{B4} независимо является водородом, дейтерием, галогеном, C_{1-4} алкилом, OC_{1-4} алкилом, SC_{1-4} алкилом, NH_2 , $NH(C_{1-4}$ алкилом), $N(C_{1-4}$ алкилом)₂, NHC

(O)C₁₋₄алкилом, C(O)OH, C(O)OC₁₋₄алкилом, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄алкилом, C(O)N(C₁₋₄алкилом)₂, CN, морфолинильным кольцом или имидазолильным кольцом, где каждый R^{B4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC₁₋₂алкилом;

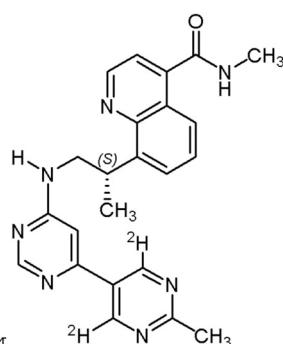
5 R^{B5} является водородом, C₁₋₄алкилом, C(O)C₁₋₄алкилом, C(O)OC₁₋₄алкилом, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄алкилом или C(O)N(C₁₋₄алкилом)₂, где указанный R^{B5} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH 10 группами или одним OC₁₋₂алкилом, и

15 R^{B6} является F или C₁₋₂алкилом, или два R^{B6} и промежуточный атом углерода образуют спироциклогептильное или спироциклогексильное кольцо.

10 В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы:



20 соединение B-1 или



25 соединение B-2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

20 В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл, содержащий соединение B-1 или его фармацевтически приемлемую соль и образователь сокристалла (ОСК), выбранный из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты и бензойной кислоты. В определенных вариантах, 25 ОСК является адипиновая кислота. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл, содержащий соединение B-2 или его фармацевтически приемлемую соль и образователь сокристалла (ОСК), выбранный из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты и бензойной кислоты. В определенных вариантах, ОСК является адипиновая кислота. В определенных вариантах, 30 молярное отношение адипиновой кислоты к соединению B-1 или адипиновой кислоты к соединению B-2 составляет от около 1 до около 2. В определенных вариантах, сокристалл вводят в интервале от около 50 мг до около 200 мг в сутки, включительно; в интервале от около 50 мг до около 2000 мг в сутки, включительно; или в интервале 35 от около 100 мг до около 1500 мг в сутки, включительно.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

40 На фиг. 1 показан план эксперимента по исследованию действия времени добавления соединения B-2 и длительности воздействия на усиление действия гидрохлорида доксорубицина. Соединение B-2, применяемое в этих экспериментах, не получено в виде сокристалла. Клетки рака легкого A549 обрабатывают доксорубицином в течение 24 часов (верхний ряд) и соединение B-2 добавляют одновременно с доксорубицином или через 4, 8, 12 или 16 часов после добавления доксорубицина (ряды A-Q). Общая 45 длительность воздействия соединения B-2 варьируется от 4 до 16 часов. Каждый ряд (A-Q) представляет один эксперимент с концентрациями доксорубицина и соединения B-2 титрованными, как описано здесь. Во всех экспериментах клетки подвергают

воздействию доксорубицина в течение полных 24 часов (черные прямоугольники в верхнем ряду). Длительность и время воздействия соединения B-2 в каждом эксперименте показано заполненными серым прямоугольниками. Белые ячейки показывают отсутствие воздействия соединения B-2 в этот период времени. Буквы справа для каждого эксперимента упоминаются в экспериментальной части.

На фиг. 2 показаны режимы дозирования для сокристалла соединения B-2 и адипиновой кислоты (2:1 молярное отношение соединения B-2:адипиновой кислоты; в данном описании "соединение B-2 CoX") в сочетании с DOXIL®. В первый день обработки, каждое животное получает DOXIL® IV за 16 ч до соединения B-2 Co-X.

10 Соединение B-2 Co-X(PO) затем вводят од в 0, 24, 48 и 72 ч (показано стрелками, направленными вверх, показывающими когда вводят соединение B-2 Co-X). Этот цикл повторяют один раз в неделю в течение двух недель.

На фиг. 3 показано действие соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на объем опухоли в CTG-0253 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей.

15 Мышам вводят DOXIL® или сочетание DOXIL® и соединения B-2 Co-X для оценки эффективности, как описано на фиг. 2 (n=4/группу).

На фиг. 4 показано действие DOXIL® или соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на массу тела в CTG-0253 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей (n=4/группу).

20 На фиг. 5 показано действие соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на объем опухоли в CTG-0486 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей. Мышам вводят DOXIL® или сочетание DOXIL® и соединения B-2 Co-X для оценки эффективности, как описано на фиг. 2 (n=4/группу).

25 На фиг. 6 показано действие DOXIL® или соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на массу тела в CTG-0486 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей (n=4/группу).

На фиг. 7 показано действие соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на объем опухоли в CTG-0964 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей. Мышам вводят DOXIL® или сочетание DOXIL® и соединения B-2 Co-X для оценки 30 эффективности, как описано на фиг. 2 (n=4/группу).

На фиг. 8 показано действие DOXIL® или соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на массу тела в CTG-0964 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей (n=4/группу).

На фиг. 9 показано действие соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на объем 35 опухоли в CTG 1166 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей. Мышам вводят DOXIL® или сочетание DOXIL® и соединения B-2 Co-X для оценки эффективности, как описано на фиг. 2 (n=4/группу).

На фиг. 10 показано действие DOXIL® или соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на массу тела в CTG 1166 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых 40 мышей (n=4/группу).

На фиг. 11 показано действие соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на объем опухоли в CTG 1423 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей. Мышам вводят DOXIL® или сочетание DOXIL® и соединения B-2 Co-X для оценки эффективности, как описано на фиг. 2 (n=4/группу).

45 На фиг. 12 показано действие DOXIL® или соединения B-2 Co-X в сочетании с DOXIL® на массу тела в CTG 1423 модели ксенотрансплантата первичной опухоли у голых мышей (n=4/группу).

На фиг. 13 показано действие соединения B-3 в сочетании с DOXIL® на объем опухоли

в модели ксенотрансплантата колонии клеток HT-29. Мышам вводят DOXIL® или сочетание DOXIL® и соединения B-3 для оценки эффективности, как описано выше.

На фиг.14 показано действие соединения B-3 в сочетании с DOXIL® на массу тела в модели ксенотрансплантата колонии клеток HT-29.

На фиг.15 показано действие соединения B-2 в сочетании с DOXIL® на объем опухоли. DOXIL® и соединение B-2 вводят в один день в модель ксенотрансплантата H460.

На фиг. 16 показано действие соединения B-2 в сочетании с DOXIL® на изменение массы тела. DOXIL® и соединение B-2 вводят в один день в модель ксенотрансплантата H460.

На фиг.17 показан режим дозирования соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД (DOXIL®). В дни лечения каждое животное получает ПЛД (ВВ) за 16 ч до соединения B-2 CoX. Соединение B-2 CoX (ПО) затем вводят однажды в 0 ч в течение двух дней. Эти циклы повторяют один раз в неделю в течение двух недель.

На фиг. 18А и фиг. 18В показаны результаты исследования эффективности и переносимости ПЛД с и без соединения B-2 CoX. На фиг. 18А (верхний график) показано действие соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД на объем опухоли в CTG-1280 модели ксенотрансплантата опухоли у голых мышей. Мышам вводят ПЛД или сочетание ПЛД и соединения B-2 для оценки эффективности, как описано в режиме дозирования на фиг. 17 (n=5/группу). На фиг. 18В (нижний график) показано действие соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД на массу тела в модели эндометриального CTG-1280 ксенотрансплантата у голых мышей (n=5/группу).

На фиг. 19А и фиг. 19В показано действие соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД (DOXIL®) на объем опухоли (фиг. 19А) и массу тела (фиг. 19В) в модели CTG-0259 ксенотрансплантата яичников у голых мышей.

На фиг. 20А и фиг. 20В показано, что соединение B-1 усиливает ДНК разрушающее действие этопозида в колонии клеток рака легкого (колония клеток A549). Данные, обозначенные кругами, показывают только этопозид в ДМСО носителе. Данные, обозначенные ромбами, показывают сочетание соединения B-1 и этопозида. Клетки A549 прединкубируют с 3 мкМ соединения B-1 или ДМСО в течение 45 минут. Этопозид добавляют до конечной концентрации 10 мкМ. Клетки собирают в указанные моменты времени после добавления этопозида и анализируют экспрессию маркеров повреждения ДНК pKAP1-S824 и γH2AX (pH2AX-S139) иммуноблоттингом и нормализуют до общего KAP1 (фиг. 20А) и общего H2AX (фиг. 20В), соответственно.

На фиг. 21А и фиг. 21В показано, что соединение B-2 усиливает ДНК разрушающее действие доксорубицина в колонии клеток рака молочной железы. Данные, показанные кругами, относятся к ДМСО контролю; данные, показанные черными квадратами, относятся к 100 нМ доксорубицина; данные, показанные белыми квадратами, относятся к 500 нМ доксорубицина; данные, показанные черными треугольниками, относятся к соединению B-2/100 нМ доксорубицина; данные, показанные белыми треугольниками, относятся к соединению B-2/500 нМ доксорубицина. Клетки DU4475 прединкубируют с 1 мкМ соединения B-2 в течение 15 минут. Доксорубицин добавляют до конечной концентрации 100 нМ или 500 нМ. Клетки собирают в указанные моменты времени после добавления доксорубицина и анализируют экспрессию маркеров повреждения ДНК pKAP1-S824 и γH2AX (pH2AX-S139) иммуноблоттингом и нормализуют до общего KAP1 (фиг. 21А) и общего H2AX (фиг. 21В), соответственно.

На фиг.22А и фиг. 22В показано, что соединение B-2 улучшает ров повреждения ДНК KAP1 и H2AX в клетках рака молочной железы MDA-MB-436 и MDA MB 468. Клетки MDA-MB-436 и MDA-MB-468 прединкубируют с 1 мкМ соединения B-2 или

ДМСО в течение 15 мин. Затем добавляют Доксорубицин до конечной концентрации 500 нМ. Клетки собирают в указанные моменты времени после добавления доксорубицина и анализируют рКАР1 (фиг. 22А) и рН2АХ (фиг. 22В).

На фиг.23А, фиг. 23В и фиг. 23С показано, что соединение В-2 улучшает короткое

- 5 вызванное доксорубицином фосфорилирование маркеров повреждения ДНК КАР1 и Н2АХ в клетках рака молочной железы МДА-МВ-468. Клетки МДА-МВ-468 прединкубируют с 1 мкМ соединения В-2 или ДМСО в течение 15 мин. Затем добавляют Доксорубицин до конечной концентрации 500 нМ. Среду удаляют из клеток и добавляют свежий 1 мкМ соединения В-2. Момент времени 8 ч эквивалентен отсутствию промывки.
- 10 10 Расписание промывок изображено на фиг. 23А. Клетки собирают в 8 ч после первого добавления доксорубицина и анализируют рКАР1 (фиг. 23В) и рН2АХ (фиг. 23С).

На фиг.24 изображена порошковая рентгенограмма (ПРД) сокристалла, полученного для соединения В-2 с адипиновой кислотой.

На фиг.25 изображен кривые термогравиметрического анализа для сокристаллов

- 15 адипиновой кислоты и соединения В-2.

На фиг.26 изображена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии для сокристаллов соединения В-2 и адипиновой кислоты.

На фиг. 27 изображен ЯМР спектр твердого состояния (тс-ЯМР) для комплексов сокристаллов соединения В-2 с адипиновой кислотой.

- 20 На фиг. 28 изображен спектр ^{13}C ЯМР формы А сокристалла адипиновой кислоты и соединения В-2.

На фиг. 29 изображен спектр ^{13}C ЯМР формы В сокристалла адипиновой кислоты и соединения В-2.

25 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано, по крайней мере, частично на неожиданном открытии, что ингибитор ДНК-ПК, введенный в течение от около 8 до около 48 часов после введения ДНК-поражающего агента, особенно эффективен при лечении пролиферативных заболеваний.

- 30 Следовательно, в аспектах изобретения представлен способ лечения пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, ДНК-поражающего агента и, через от около 8 до около 48 часов, введение субъекту соединения, которое ингибирует ДНК-ПК ("первая доза").

Другими словами, аспекты данного изобретения относятся к способу лечения 35 пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, терапевтически эффективного количества ДНК-поражающего агента и, через от около 8 до около 48 часов, введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует ДНК-ПК ("первая доза"). Говоря по другому, аспекты изобретения относятся к способу лечения пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, (терапевтически эффективного количества) ДНК-поражающего агента и, во время фазы восстановления ДНК, вызванной ДНК-поражающим агентом, введение субъекту (терапевтически эффективного количества) соединения, которое ингибирует ДНК-ПК ("первая доза").

- 40 45 В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 8 до около 30 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 8 до около 20 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 10 до около 20 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение

от около 12 до около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 14 до около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 14 до около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 14, 15, 16, 17 или 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-поражающим агентом является химиотерапия, наиболее предпочтительно, доксорубициновый агент.

10 Понятно, что в данном описании численные интервалы (например, от около 8 до около 48 часов) являются включительными, что означает, что интервал включает оба обозначенных крайних значения (например, в этом случае, крайние значения от около 8 часов до около 48 часов включены в интервал).

15 В некоторых вариантах, в которых ДНК-поражающий агент дают один раз за цикл лечения (например, 1-недельный цикл лечения, 2-недельный цикл лечения, 3-недельный цикл лечения, 4-недельный цикл лечения), ингибитор ДНК-ПК может вводиться в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после ДНК-поражающего агента.

20 В определенных вариантах, вторую, третью и/или четвертую дозу ингибитора ДНК-ПК вводят в последующие дни после введения первой дозы ингибитора ДНК-ПК во время данного цикла лечения. См., например, фиг. 2 и фиг. 17. Например, в определенных вариантах, цикл лечения включает введение первой дозы и второй дозы ингибитора ДНК-ПК. В определенных вариантах, цикл лечения включает введение первой дозы, 25 второй дозы и третьей дозы ингибитора ДНК-ПК. В определенных вариантах, цикл лечения включает введение первой дозы, второй дозы, третьей дозы и четвертой дозы ингибитора ДНК-ПК. В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в день 1, ингибитор ДНК-ПК вводят в день 2 (например, через от около 14 до 18 часов после введения ДНК-поражающего агента) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 30 3 (например, через около 23-26 часов после, непосредственно перед введением ДНК-ПК) данного цикла лечения. В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в день 1, ингибитор ДНК-ПК вводят в день 2 (например, через от около 14 до 18 часов после введения ДНК-поражающего агента) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 3 (например, через около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 4 (например, через около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК) данного цикла лечения. В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в день 1, ингибитор ДНК-ПК вводят в день 2 (например, около 14-18 часов после введения ДНК-поражающего агента) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 3 (например, около 23-26 часов после 35 непосредственно перед введением ДНК-ПК) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 4 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 5 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК) данного цикла лечения.

40 В некоторых вариантах, способ является частью 1-недельного, 2-недельного, 3-недельного, 4-недельного, 5-недельного, 6-недельного, 7-недельного или 8-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 1-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 2-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 3-недельного цикла лечения. В

некоторых вариантах, способ является частью 4-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 5-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 6-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 7-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, способ является частью 8-недельного цикла лечения. В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент вводят один раз за цикл лечения. В некоторых таких вариантах, ДНК-поражающий агент или ингибитор ДНК-ПК не вводят после второй дозы ингибитора ДНК-ПК в течение оставшегося времени цикла лечения. Например, способ лечения пролиферативного расстройства с применением 4-недельного цикла лечения может включать введение ДНК-поражающего агента в день 1, первой дозы ингибитора ДНК-ПК в день 2 (например, около 14-18 часов после введения ДНК-поражающего агента) и другие дозы ингибитора ДНК-ПК в день 3 (вторую дозу) и/или в день 4 (третью дозу) и/или в день 5 (четвертую дозу) цикла.

15 В некоторых таких вариантах, для одного цикла, ДНК-поражающий агент вводят в день 1, ингибитор ДНК-ПК вводят в день 2 (например, около 14-18 часов после введения ДНК-поражающего агента), и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 3 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК). В других таких вариантах, для одного цикла, ДНК-поражающий агент вводят в день 1, ингибитор ДНК-ПК вводят в день 2 (например, около 14-18 часов после введения ДНК-ПК вводят в день 3 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК), и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 4 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК). В других таких вариантах, для одного цикла, ДНК-поражающий агент вводят в день 1, ингибитор ДНК-ПК вводят в день 2 (например, около 14-18 часов 25 после введения ДНК-поражающего агента) и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 3 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК), и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 4 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК), и затем ингибитор ДНК-ПК вводят в день 5 (например, около 23-26 часов после непосредственно перед введением ДНК-ПК). 30

В некоторых вариантах, в которых ДНК-поражающий агент дают два раза за цикл лечения (например, 2-недельный цикл лечения, 3-недельный цикл лечения, 4-недельный цикл лечения), ингибитор ДНК-ПК может вводиться в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до 35 около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после одного введения ДНК-поражающего агента или после каждого введения. В определенных вариантах, первая доза ДНК-поражающего агента может вводиться в день 1, и ингибитор ДНК-ПК может вводиться в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после. В некоторых таких вариантах, вторая доза ДНК-поражающего агента может вводиться в течение от около 5 дней до около 9 дней после предшествующего (например, непосредственно перед) введения ДНК-поражающего агента. Например, вторая доза ДНК-поражающего агента может вводиться в течение от около 5 дней до около 9 дней, от около 5 дней до около 8 дней, от около 5 дней до около 7 дней, от 40 около 6 дней до около 9 дней, от около 6 дней до около 8 дней или от около 6 дней до около 7 дней после первой дозы ДНК-поражающего агента. В некоторых случаях, вторая доза ДНК-поражающего агента может вводиться через от около 6 дней до около 8 дней или через около 7 дней. В некоторых вариантах, вторая доза ДНК-ПК 45

ингибитора может вводиться в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после второй дозы ДНК-поражающего агента.

В некоторых вариантах, в которых ДНК-поражающий агент вводят три или более раз за цикл лечения (например, 3-5 введений), ингибитор ДНК-ПК может вводиться в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после, по крайней мере, одного введения ДНК-поражающего агента (например, после одного введения, после каждого из двух введений, после каждого из трех введений) или после каждого введения.

В некоторых вариантах, два или более разных ДНК-поражающих агентов могут вводиться в течение цикла лечения (например, 3-недельного цикла лечения, 4-недельного цикла лечения). ДНК-поражающие агенты могут отличаться механизмом действия и/или частотой введения. Например, первый ДНК-поражающий агент вводят дважды за цикл лечения, и второй ДНК-поражающий агент вводят один раз за цикл лечения. В некоторых таких вариантах, первый ДНК-поражающий агент и второй ДНК-поражающий агент могут вводиться, как описано выше для введения одного ДНК-поражающего агента. ДНК-ПК ингибитор может вводиться в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после, по крайней мере, одного ДНК-поражающего агента (например, двух ДНК-поражающих агентов, после каждого из двух введений).

В данном описании термин "цикл лечения" имеет обычное для данной области техники значение, и может означать курс лечения, который повторяется на регулярной основе, включая периоды отдыха. Например, цикл лечения из четырех недель может включать введение агентов в течение первой недели с последующими тремя неделями отдыха (например, без лечения). В общем, ДНК-ПК ингибитор может вводиться, по крайней мере, один раз за цикл лечения и в течение от около 8 часов до около 48 часов (например, от около 8 часов до около 30 часов, от около 10 часов до около 20 часов, от около 14 часов до около 18 часов) после ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, описанные здесь способы могут быть частью 3-недельного или 4-недельного цикла лечения.

В некоторых вариантах, лечение пролиферативного заболевания с применением описанных здесь способов может вызвать стабильное заболевание по КООПСО, частичную реакцию по КООПСО или полную реакцию по КООПСО. Например, лечение может дать частичную по КООПСО или полную по КООПСО реакцию. В данном описании, термин "частичная реакции по КООПСО" имеет свое обычное в данной области значение и может означать 30% снижение суммы наиболее длинного диаметра целевых очагов, определенную по инструкции КООПСО (т.е., Критериям Оценки Ответа при Солидных Опухолях), версия 1.1 (см. Eisenhauer et. al., Eur. J. Cancer, 45 (2009) 228-247). В данном описании термин "полная реакция по КООПСО" имеет свое обычное в данной области значение и может означать исчезновение всех целевых очагов, определенное по инструкции КООПСО, версия 1.1. В данном описании термин "прогрессирующее заболевание по КООПСО" имеет свое обычное в данной области значение и может означать 20% увеличение суммы наиболее длинного диаметра целевых очагов, определенное по инструкции КООПСО, версия 1.1. В данном описании термин "стабильное заболевание по КООПСО" имеет свое обычное в данной области значение и может означать незначительные изменения, которые не соответствуют критериям,

определенные по инструкции КООПСО, версия 1.1.

В общем, лечение пролиферативного расстройства описанными здесь способами может обращать, облегчать, замедлять наступление или ингибиовать развитие пролиферативного расстройства. В некоторых вариантах, описанные здесь способы

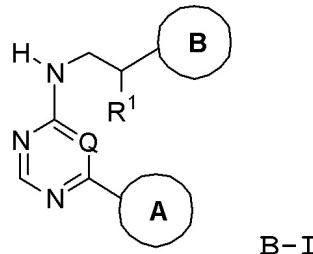
- 5 могут снижать сумму наиболее длинного диаметра целевых очагов, снижать сумму наиболее длинного диаметра не целевых очагов и/или снижать массу опухоли на, по крайней мере, около 10%, по крайней мере, около 20%, по крайней мере, около 30%, по крайней мере, около 40%, по крайней мере, около 50% или, по крайней мере, около 60%. В определенных вариантах, описанные здесь способы могут снижать сумму
- 10 наиболее длинного диаметра целевых очагов, снижать сумму наиболее длинного диаметра не целевых очагов и/или снижать массу опухоли на от около 20% до около 60% или от около 40% до около 60%.

- 15 В некоторых вариантах, описанные здесь способы могут быть особенно полезны для лечения пролиферативных расстройств у субъектов, которые трудно поддаются лечению, резистентны или чувствительны к одному или более ДНК-поражающим агентам.

- 20 В данном описании термины "трудно поддаются лечению" имеют свое обычное в данной области значение и могут означать пролиферативное расстройство, которое прогрессирует во время лечения агентом (например, ДНК-поражающим агентом) (лечение первой линии). В данном описании термин "резистентное" имеет свое обычное в данной области значение и может означать пролиферативное расстройство, которое рецидивирует в течение определенного периода времени после завершения лечения агентом (например, ДНК-поражающим агентом). В данном описании термин "чувствительное" имеет свое обычное в данной области значение и может означать пролиферативное расстройство, которое рецидивирует после определенного периода времени после завершения лечения агентом (например, ДНК-поражающим агентом). В общем, рецидив возникает после более длительного периода времени для чувствительного рака, чем для резистентного рака. Периоды времени для классификации пролиферативного расстройства на резистентное или чувствительное известны специалистам в данной области техники и могут зависеть от определенных факторов, таких как тип рака, применяемое лечение и стадия рака, среди прочих. Например, резистентным раком яичников может называться рак яичников, который рецидивирует через 6 месяцев после завершения лечения. Чувствительным раком яичников может называться рак яичников, который рецидивирует в течение более 6 месяцев после окончания лечения. Например, резистентным мелкоклеточным раком легких (МКРЛ) может называться МКРЛ, который рецидивирует в течение 3 месяцев после завершения лечения. Чувствительным МКРЛ может называться МКРЛ, который рецидивирует через более чем 3 месяца после завершения лечения.

Compounds

- 40 В некоторых аспектах данного описания ингибитор ДНК-ПК представлен формулой (B-I):



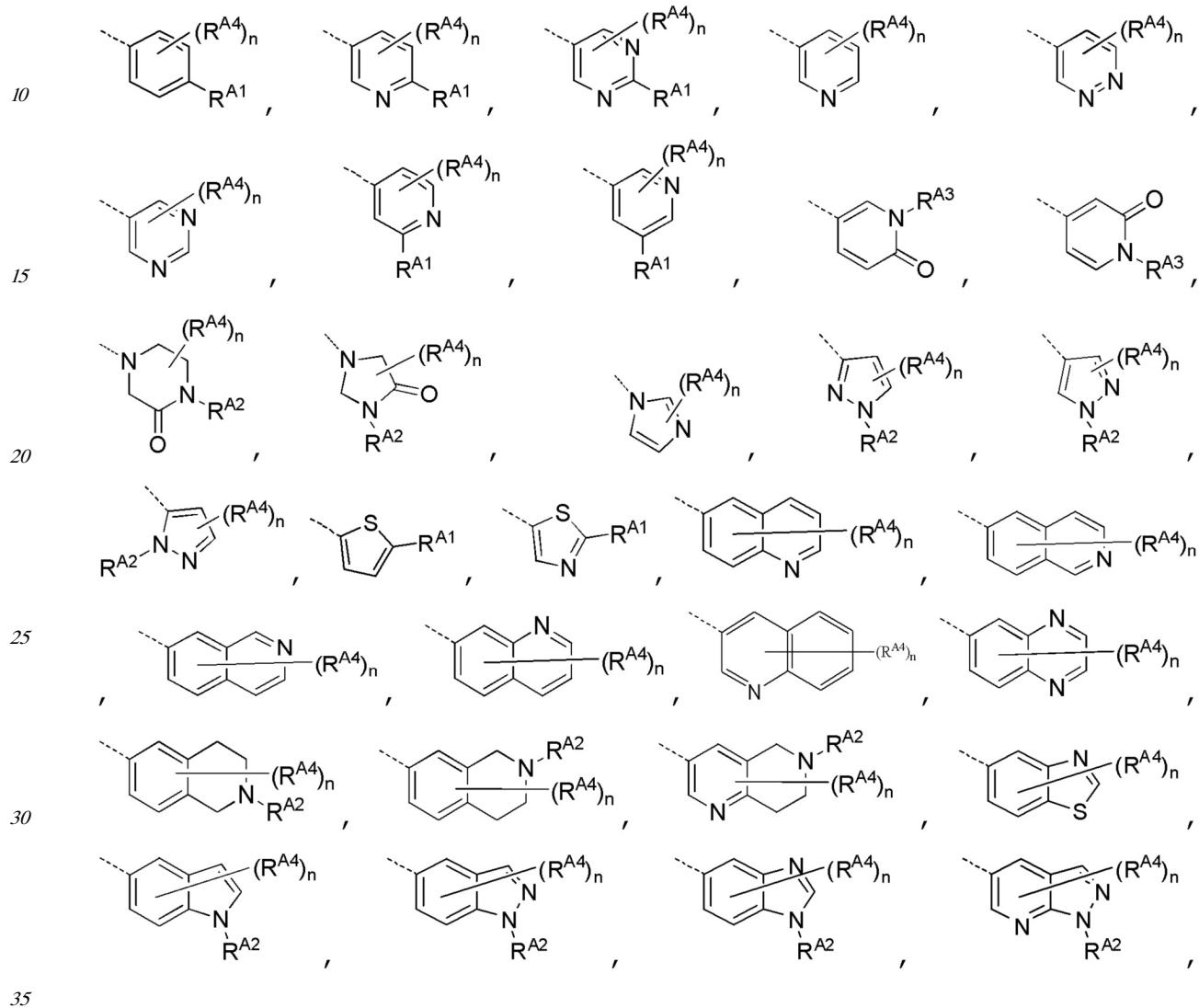
или его фармацевтически приемлемой солью,

где:

Q является N или CH;

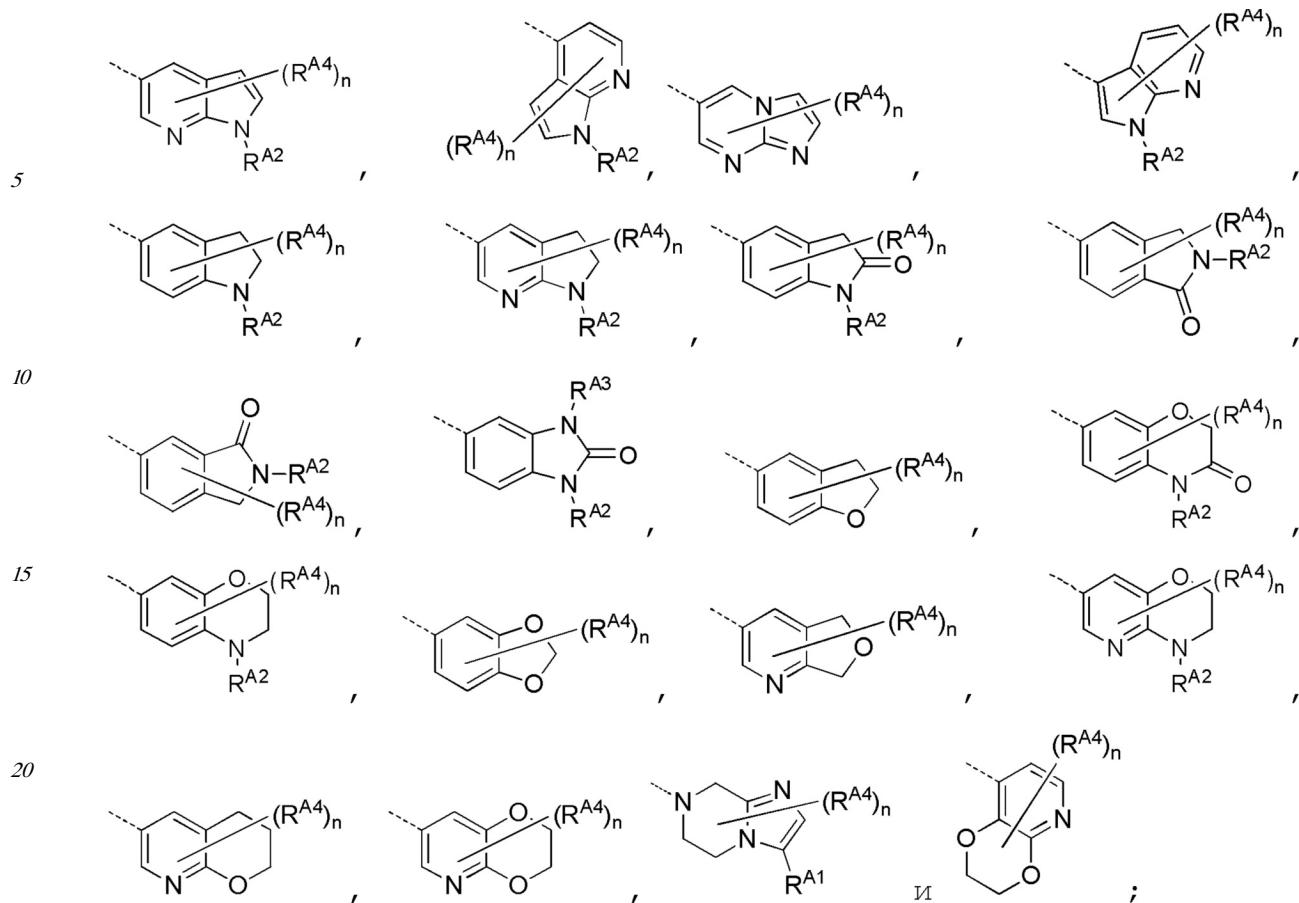
5 R¹ является водородом, CH₃ или CH₂CH₃, или R¹ и атом углерода, к которому он присоединен, образуют C=CH₂ группу;

Кольцом А является система колец, выбранная из группы, состоящей из:



40

45



R^{A1} является водородом, галогеном, C_{1-4} алкилом, C_{0-4} алкил- C_{3-6} циклоалкилом,
 C_{0-4} алкил- OR^{A1a} , C_{0-4} алкил- SR^{A1a} , C_{0-4} алкил- $C(O)N(R^{A1a})_2$, C_{0-4} алкил- CN , C_{0-4} алкил- S
 $(O)-C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $S(O)_2-C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $C(O)OR^{A1b}$, C_{0-4} алкил- C
 $(O)C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})C(O)R^{A1a}$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})S(O)_2R^{A1a}$, C_{0-4} алкил-
 $N(R^{A1a})_2$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})(3-6$ -членным циклоалкилом), C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})(4-6$ -членным
 30 гетероциклизом), $N(R^{A1b})C_2-4$ алкил- $N(R^{A1a})_2$, $N(R^{A1b})C_2-4$ алкил- OR^{A1a} , $N(R^{A1b})C_{1-4}$ алкил-
 $(5-10$ -членным гетероарилом), $N(R^{A1b})C_{1-4}$ алкил-(4-6-членным гетероциклизом),
 35 $N(R^{A1b})C_2-4$ алкил- $N(R^{A1b})C(O)R^{A1a}$, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})C(O)C_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил-
 $N(R^{A1b})C(O)OC_{1-4}$ алкилом, C_{0-4} алкил(фенилом), C_{0-4} алкил-(3-10-членным
 40 гетероциклизом), C_{0-4} алкил- $C(O)-(4-6$ -членным гетероциклизом), C_{0-4} алкил- $O-C_{0-4}$ алкил-
 $(4-6$ -членным гетероциклизом), C_{0-4} алкил-(5-6-членным гетероарилом), C_{0-4} алкил- $C(O)$
 45 -(5-6-членным гетероарилом), C_{0-4} алкил- $O-C_{0-4}$ алкил-(5-6-членным гетероарилом),
 C_{0-4} алкил- $N(R^{A1a})(4-6$ -членным гетероциклизом) или C_{0-4} алкил- $N(R^{A1b})(5-6$ -членным
 50 гетероарилом), где каждый из указанных R^{A1} гетероциклизов является системой колец,
 55 выбранной из азиридинила, оксетанила, тетрагидропиран, тетрагидрофуранила,
 60 диоксанила, диоксоланила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила,
 65 пирролидиндионила, морфолинила, пиперидинила, пиперазинила, пиперазинонила,
 70 тетрагидротиотиофендиоксида, 1,1-диоксотиетанила, 2-окса-6-азаспиро[3,4]октанила

и изоиндолинонила, где каждый из указанных R^{A1} гетероарилов является система колец, выбранная из фуранила, тиофенила, имидазолила, бензоимидазолила, оксазолила, оксадиазолила, тиазолила, пиразолила, тиадиазолила, пиридинила, пиrimидинила,

5 пиразинила, триазолила и тетразолила, и где каждая из указанных R^{A1} алкильных, циклоалкильных, фенильных, гетероциклических и гетероарильных групп необязательно замещены вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, C_{3-6} циклоалкильными группами, фенильной группой, бензильной группой, алкенил- C_{0-2} алкильной группой, алкинил- C_{0-2} алкильной группой, вплоть до двух раз,

10 C_{0-2} алкил- OR^{A1b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A1b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, S

(O)₂ C_{1-4} алкильной группой, $C(O)R^{A1b}$ группой, $C(O)OR^{A1b}$ группой, $C(O)N(R^{A1b})_2$

группой, -CN группой или C_{4-6} гетероциклической кольцевой системой, выбранной из оксетанила, тетрагидрофуранила, тетрагидропирана, пиперидинила и морфолинила;

15 каждый R^{A1a} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{3-6} циклоалкилом, C_{4-6} гетероцикликом, выбранным из оксетанила, тетрагидрофуранила, тетрагидропирана, пирролидинила и пиперидинила, C_{5-6} гетероарилом, выбранным из имидазолила, триазолила, тетразолила, пиразолила, тиофенила, тиазолила, пиридинила, пиrimидинила и пиразинила, или два R^{A1a} и атом азота между ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонаила, пиперидинила, пиперидинонаила, тетрагидропиридинила, пиперазинила и морфолинила, где каждая из указанных R^{A1a} алкильных,

20 циклоалкильных, гетероциклических и гетероарильных групп необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до трех раз 2H, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, C_{3-6} циклоалкильной группой, вплоть до двух раз, C_{0-2} алкил- OR^{A1b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A1b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, $C(O)R^{A1b}$

25 группой, $C(O)OR^{A1b}$ группой, $C(O)N(R^{A1b})_2$ группой или -CN группой;

каждый R^{A1b} независимо является водородом, C_{1-2} алкилом или C_{3-4} циклоалкилом;

30 R^{A2} является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{0-4} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-2} алкил-(4-6-членным)гетероцикликом, C_{2-4} алкил- OR^{A2a} , C_{0-2} алкил- $C(O)N(R^{A2a})_2$, C_{0-2} алкил- S (O)₂ C_{1-4} алкилом, C_{0-2} алкил- $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, C_{0-2} алкил- $C(O)$ -(4-6-членным) гетероцикликом, где каждый из указанных гетероцикликолов выбирают из оксетанила, тетрагидропирана, тетрагидрофуранила, диоксанила, диоксоланила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонаила, пирролидинонионаила, морфолинила, пиперидинила, пиперазинила, пиперазинонаила и 1,1-диоксотетанила, и каждая из указанных R^{A2} групп за исключением водорода необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, C_{3-6} циклоалкильной группой,

35 алкенил- C_{0-2} алкильной группой, алкинил- C_{0-2} алкильной группой, вплоть до двух раз, OR^{A2b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A2b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, S

(O)₂ C_{1-4} алкильной группой, $C(O)R^{A2b}$ группой, $C(O)OR^{A2b}$ группой, $C(O)N(R^{A2b})_2$

группой или -CN группой;

каждый R^{A2a} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{5-6} гетероарилом, выбранным из имидазолила, триазолила, тетразолила, пиразолила, тиофенила, 5 тиазолила, пиридинила, пиримидинила и пиразинила, или два R^{A2a} и атом азота между ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила, пиперидинонила, тетрагидропиридинила, пiperазинила и морфолинила;

каждый R^{A2b} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом или C_{3-4} циклоалкилом;

10 R^{A3} является водородом или C_{1-2} алкилом;

каждый R^{A4} независимо является дейтерием, галогеном, CN , C_{1-4} алкилом или OC_{1-4} алкилом, где каждый R^{A4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами 15 F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом, или два R^{A4} вместе с промежуточным насыщенным атомом углерода образуют спиро-связанное циклопропильное или циклобутильное кольцо;

n равно 0-3;

Кольцом В является система колец, выбранная из группы, состоящей из:

20

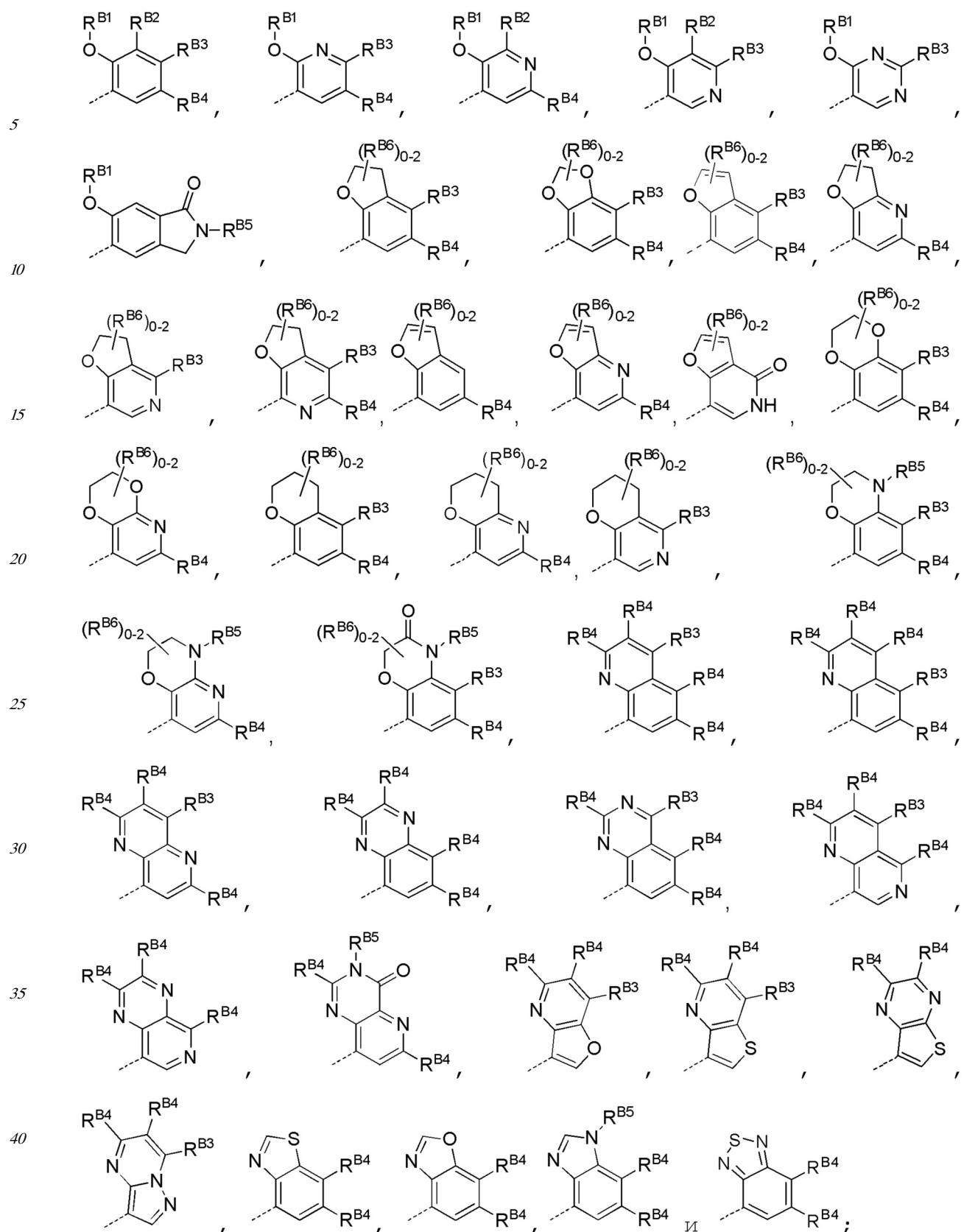
25

30

35

40

45



R^{B1} является водородом, C_{1-4} алкилом, $(CH_2)_{0-1}C_{3-6}$ циклоалкилом, $C(O)C_{1-2}$ алкилом, $(CH_2)_{0-1}-(4-6\text{-членным})$ гетероциклическим кольцом, где указанное гетероциклическое кольцо выбирают из оксетанила, тетрагидрофуранила, тетрагидропирана, диоксанила, диоксоланила и пирролидинонаила, или $(CH_2)_{1-2}(5-6\text{-членным})$ гетероарильным кольцом,

где указанное гетероарильное кольцо выбирают из пиридинила, имидазолила и пиразолила, и где каждая из указанных R^{B1} алкильных, циклоалкильных, фенильных, бензильных, гетероциклических и гетероарильных групп необязательно замещена вплоть до 3 раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, двумя не 5 геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом;

R^{B2} является водородом, C_{1-4} алкилом или OC_{1-4} алкилом;

каждый R^{B3} независимо является водородом, галогеном, C_{1-4} алкилом, C_{2-4} алкенилом, C_{2-4} алкинилом, CN , $C(O)H$, $C(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, $C(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом, $C(O)NH(CH_2)_{0-1}C_{3-6}$ циклоалкилом, $C(O)NHCH_2$ оксетанилом, $C(O)NHCH_2$ тетрагидрофуранилом, $C(O)NHCH_2$ тетрагидропиранилом, $C(O)NH$ фенилом, $C(O)NH$ бензилом, $C(O)NHOH$, $C(O)NHOC_{1-4}$ алкилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}C_{3-6}$ циклоалкилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}$ оксетанилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}$ тетрагидрофуранилом, $C(O)NHO(CH_2)_{0-1}$ тетрагидропиранилом, $C(O)NHO$ фенилом, $C(O)NHO$ бензилом, NH_2 , $NHC(O)C_{1-4}$ алкилом, OC_{1-4} алкилом, SC_{1-4} алкилом, $S(O)C_{1-4}$ алкилом или 5-членной гетероарильной системой колец, выбранной из фуранила, тиофенила, имидазолила, 20 пиррола, пиразолила и оксадиазолила, где каждая R^{B3} группа за исключением водорода или галогена необязательно замещена Cl, вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами, вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом, одним NH_2 , одним NHC_{1-2} алкилом, одним $NHC(O)C_{1-2}$ алкилом или одним $N(C_{1-2}$ алкилом)₂;

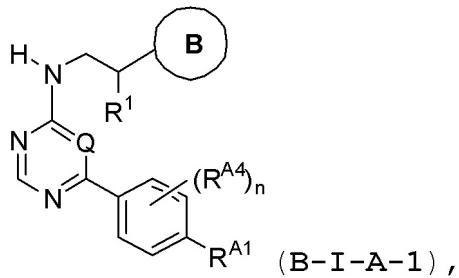
каждый R^{B4} независимо является водородом, дейтерием, галогеном, C_{1-4} алкилом, OC_{1-4} алкилом, SC_{1-4} алкилом, NH_2 , $NH(C_{1-4}$ алкилом), $N(C_{1-4}$ алкилом)₂, $NHC(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)OH$, $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом, $C(O)N(C_{1-4}$ алкилом)₂, CN , морфолинильным кольцом или имидазолильным кольцом, где

каждый R^{B4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом;

R^{B5} является водородом, C_{1-4} алкилом, $C(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом или $C(O)N(C_{1-4}$ алкилом)₂, где указанный R^{B5} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом; и

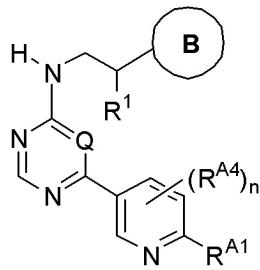
R^{B6} является F или C_{1-2} алкилом, или два R^{B6} и промежуточный атом углерода образуют спироциклогексильное или спироциклогексильное кольцо.

40 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:

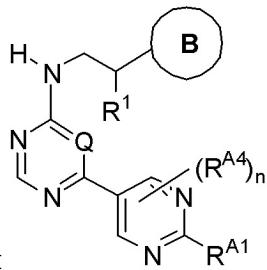


или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

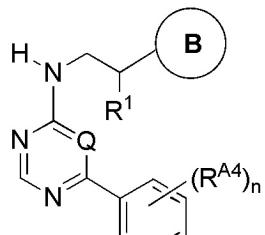


(B-I-A-2) или (B-I-A-3),

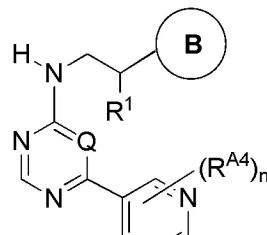


10 или его фармацевтически приемлемая соль.

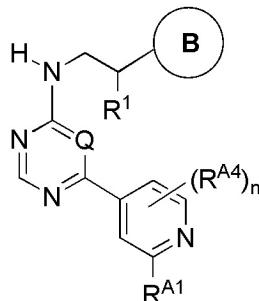
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



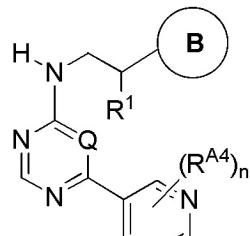
(B-I-A-4),



(B-I-A-5),



(B-I-A-6),



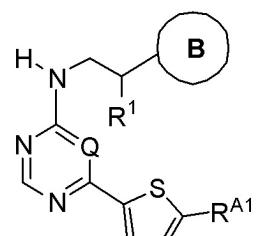
(B-I-A-7) или



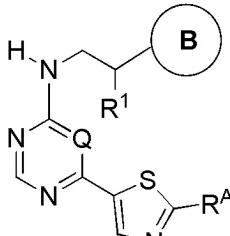
(B-I-A-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



(B-I-A-9) или



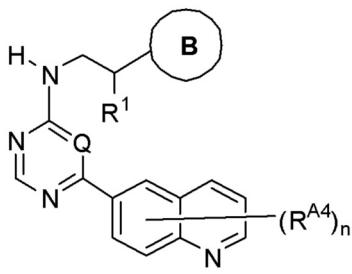
(B-I-A-10),

или его фармацевтически приемлемая соль.

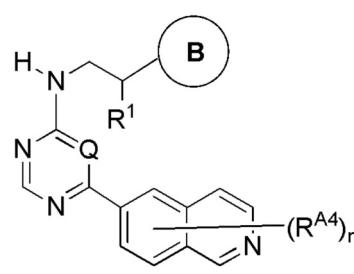
В другом варианте для любого соединения формул B-I-A-1 - B-I-A-3, B-I-A-6 - B-I-

5 А-7 или B-I-A-9 - B-I-A-10, R^{A1} является C_{1-4} алкилом, OC_{1-4} алкилом или $N(R^{A1a})_2$, где
каждый R^{A1a} независимо является водородом или C_{1-4} алкилом, или два R^{A1a} и атом
азота между ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из
азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила,
пиперидинонила, тетрагидропиридинила, пiperазинила и морфолинила, где каждая из
указанных R^{A1} алкильных или гетероциклических групп необязательно замещена вплоть
до трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами 2H , вплоть до двух раз,
10 C_{1-2} алкильными группами, C_{3-6} циклоалкильной группой, вплоть до двух раз, C_{0-2} алкил-
 OR^{A1b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A1b})_2$ группой, SC_{1-4} алкильной группой, $C(O)R^{A1b}$
группой, $C(O)OR^{A1b}$ группой, $C(O)N(R^{A1b})_2$ группой или $-CN$ группой, где каждый R^{A1b}
независимо является водородом, C_{1-2} алкилом или C_{3-4} циклоалкилом.

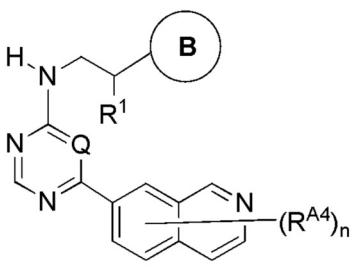
15 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



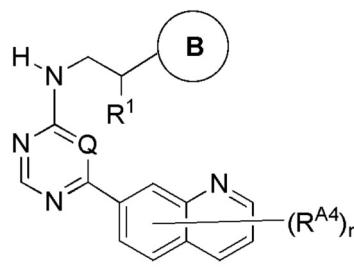
(B-I-A-11),



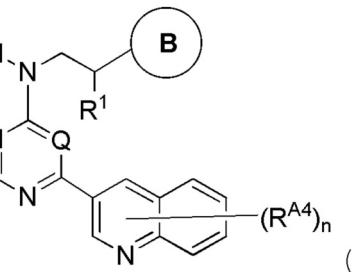
(B-I-A-12),



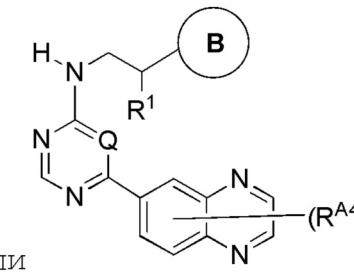
(B-I-A-13),



(B-I-A-14),



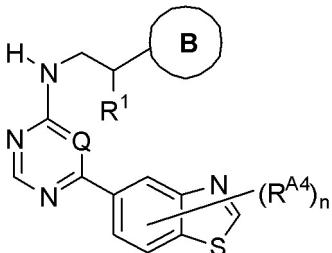
(B-I-A-15) или



(B-I-A-16),

40 или его фармацевтически приемлемая соль.

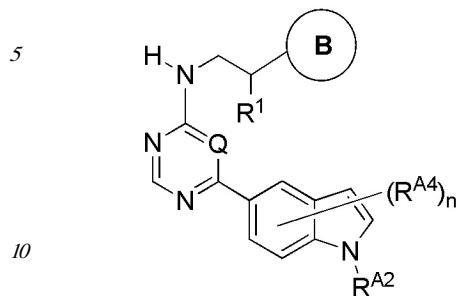
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



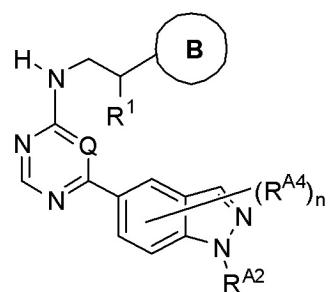
(B-I-A-17),

или его фармацевтически приемлемая соль.

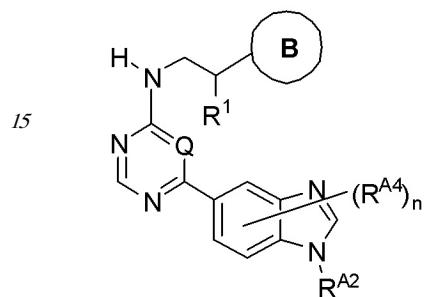
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



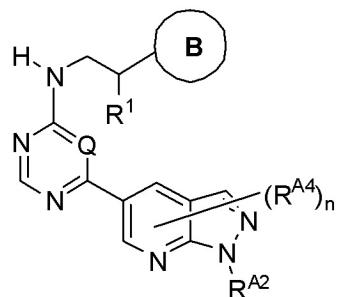
(B-I-A-18),



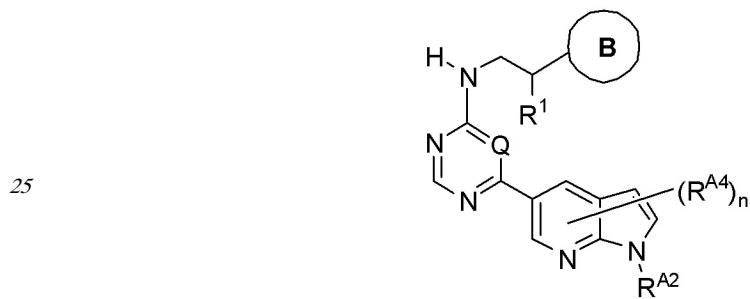
(B-I-A-19),



(B-I-A-20),



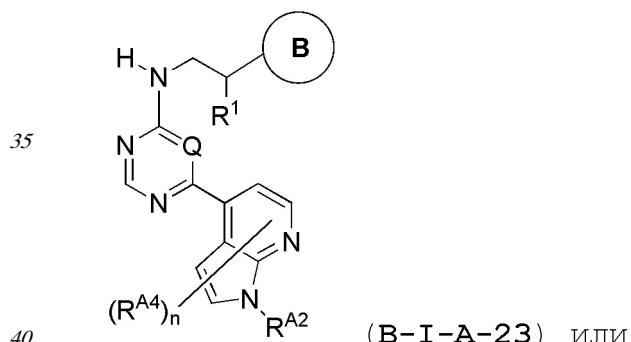
(B-I-A-21) или



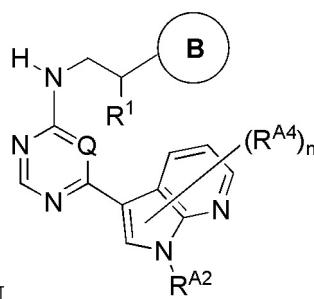
(B-I-A-22),

или его фармацевтически приемлемая соль.

30 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



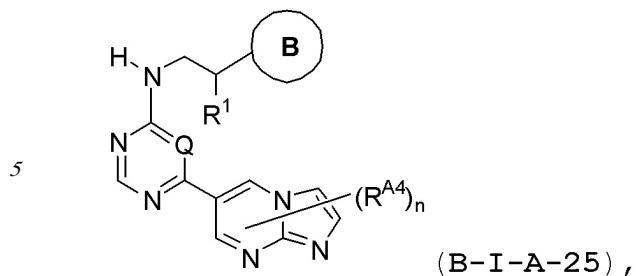
(B-I-A-23) или



(B-I-A-24),

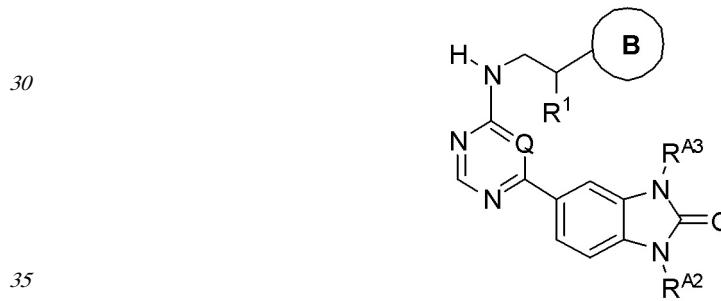
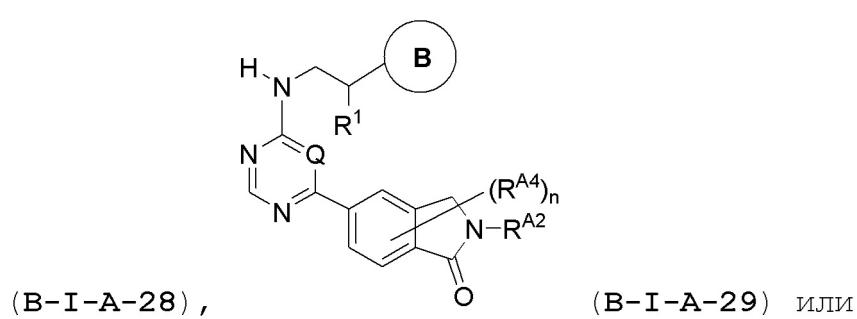
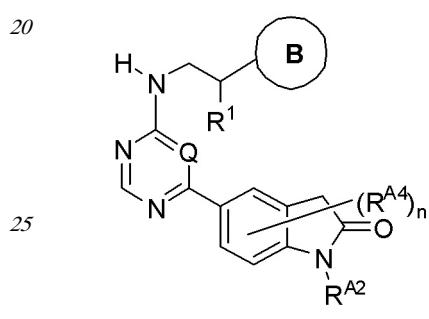
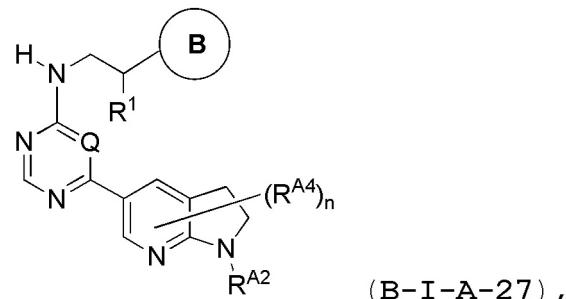
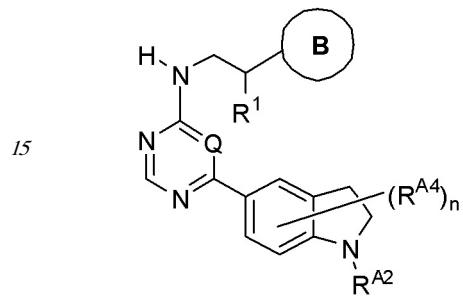
или его фармацевтически приемлемая соль.

45 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль.

10 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

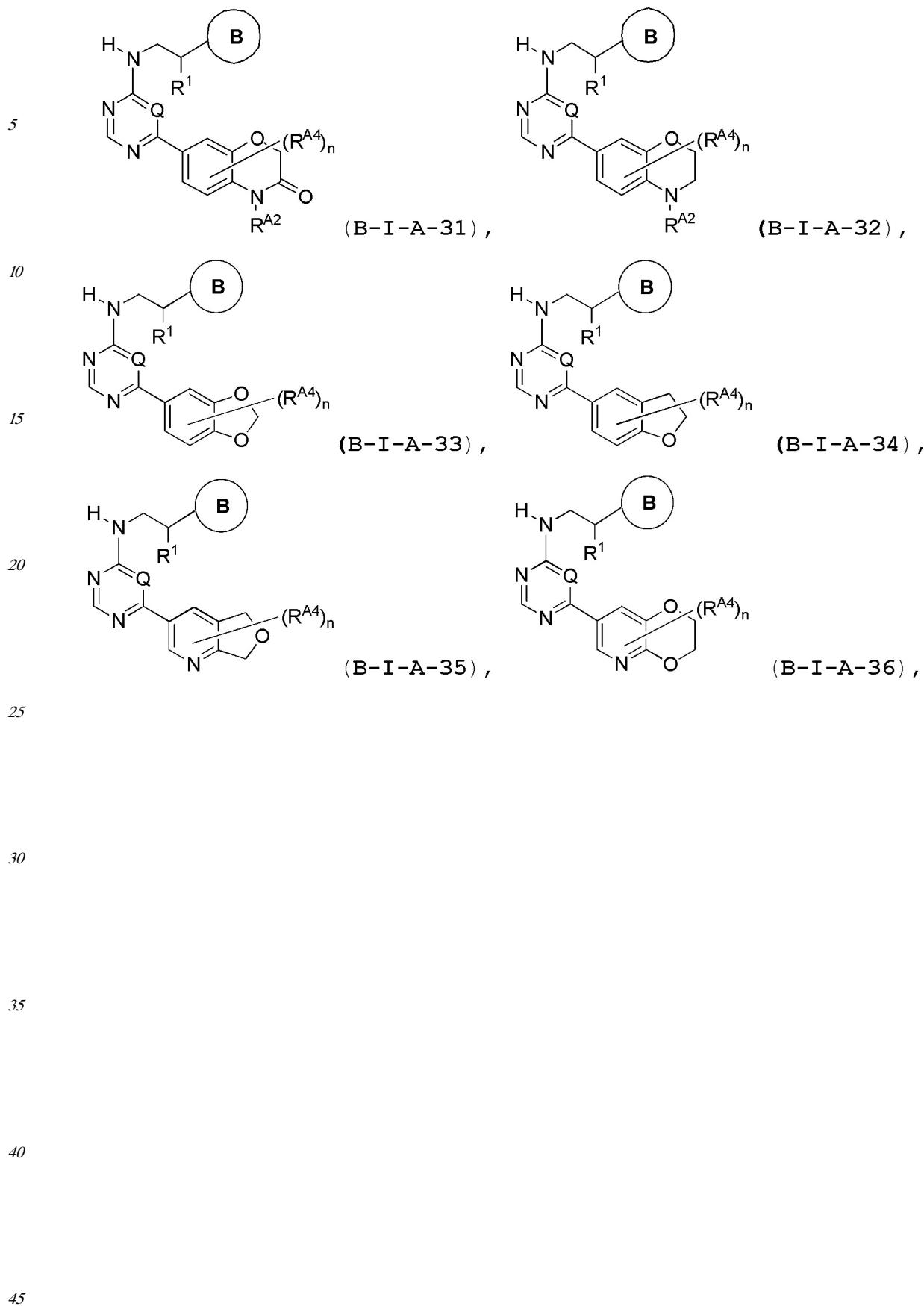


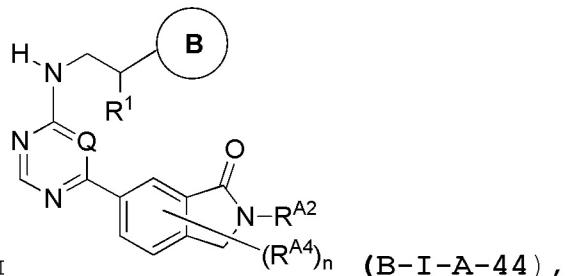
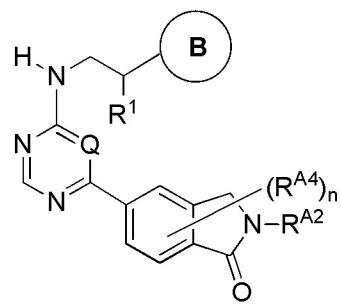
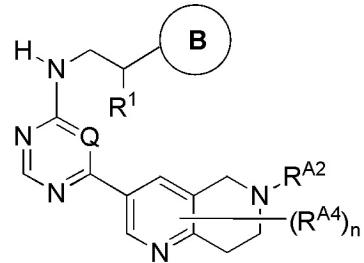
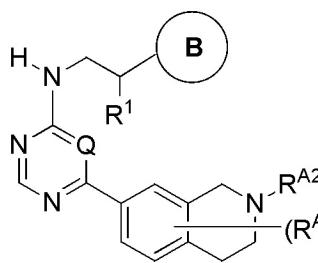
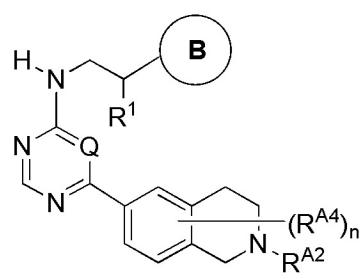
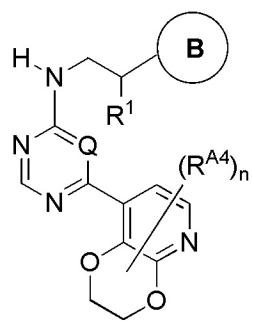
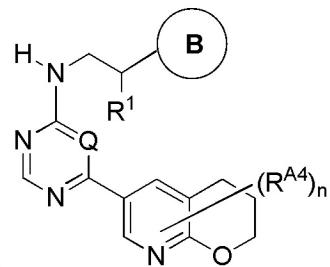
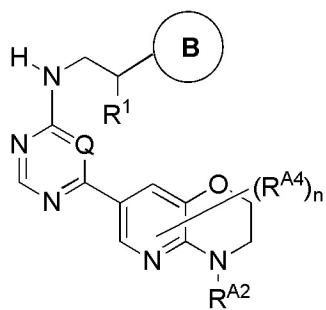
или его фармацевтически приемлемая соль.

30 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

40

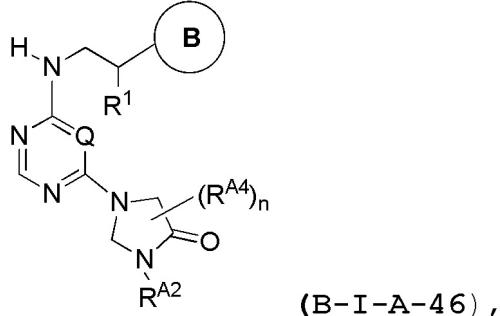
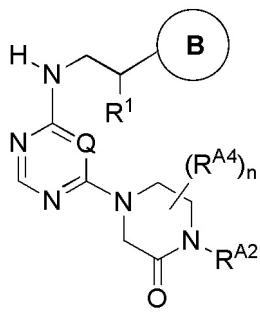
45

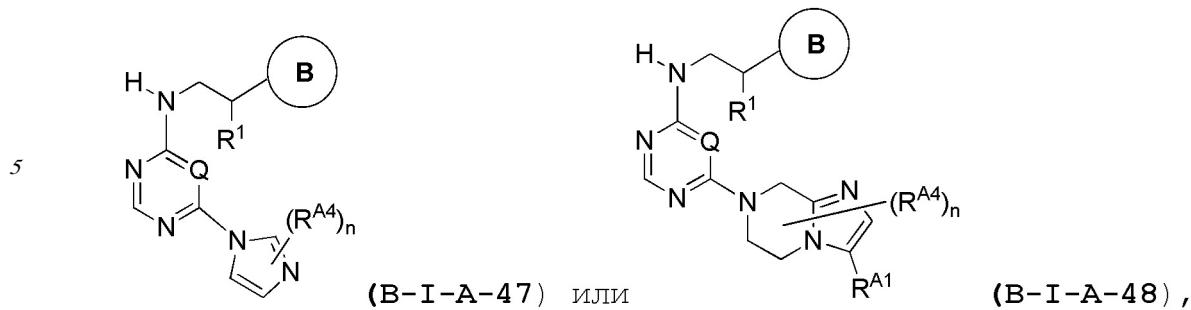




или его фармацевтически приемлемая соль.

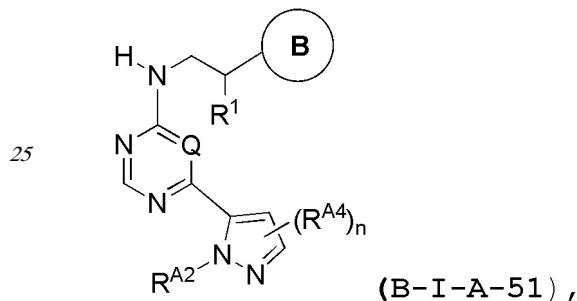
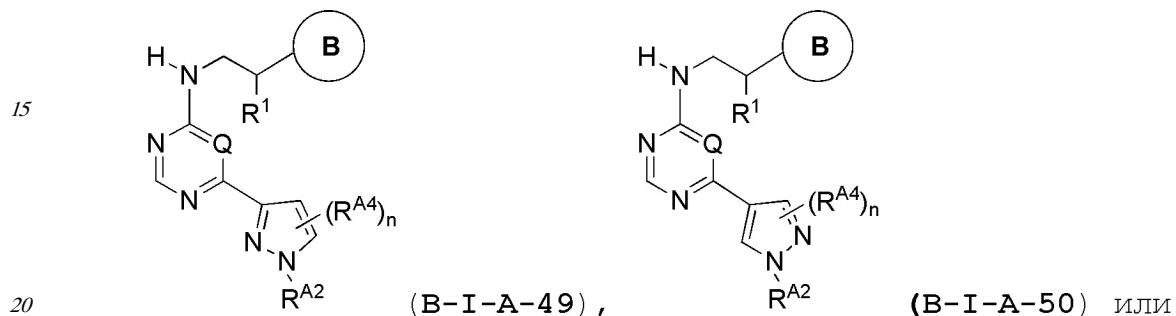
35 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:





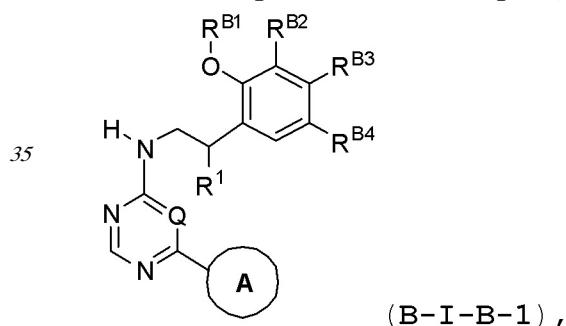
или его фармацевтически приемлемая соль.

10 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



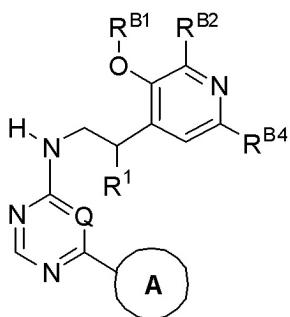
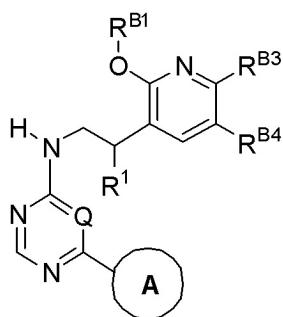
25 или его фармацевтически приемлемая соль.

30 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:

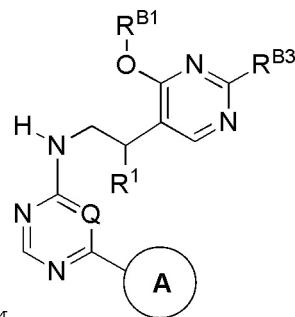
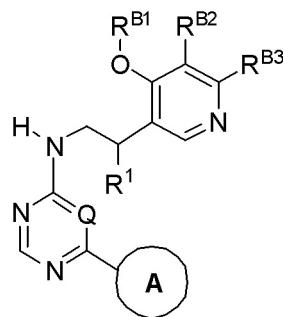


40 или его фармацевтически приемлемая соль.

45 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



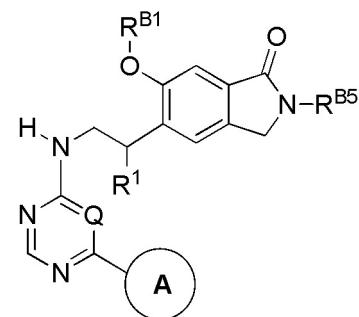
(B-I-B-2), (B-I-B-3),



(B-I-B-4) или (B-I-B-5),

или его фармацевтически приемлемая соль.

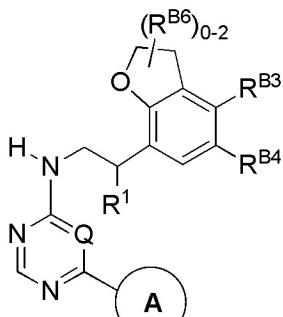
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



(B-I-B-6),

или его фармацевтически приемлемая соль.

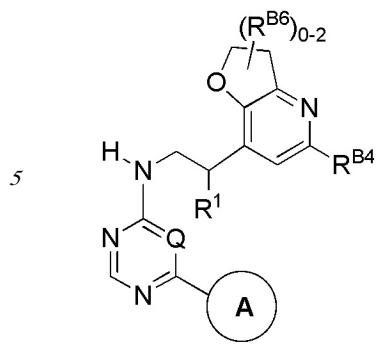
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



(B-I-B-7),

или его фармацевтически приемлемая соль.

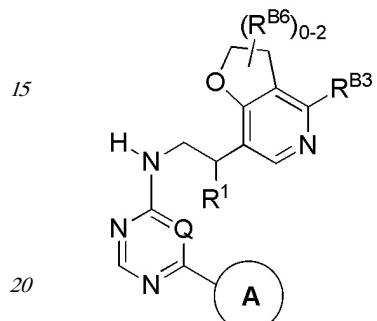
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



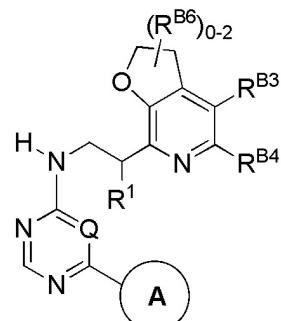
(B-I-B-8),

10 или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



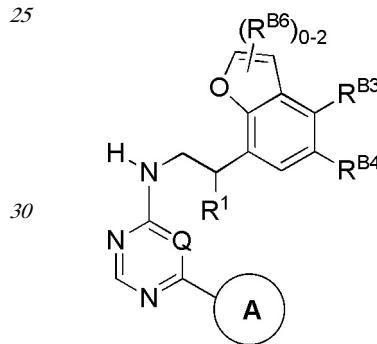
(B-I-B-9) или



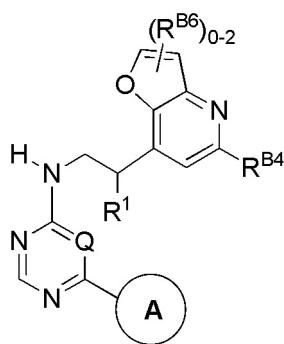
(B-I-B-10),

или его фармацевтически приемлемая соль.

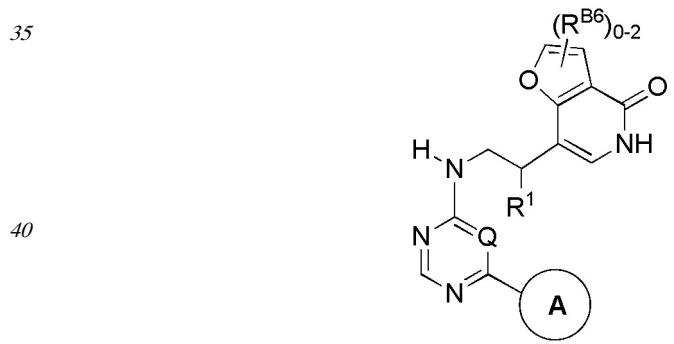
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



(B-I-B-11),



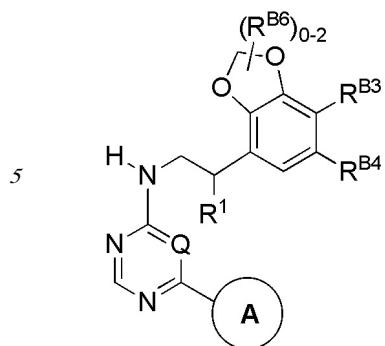
(B-I-B-12) или



(B-I-B-13),

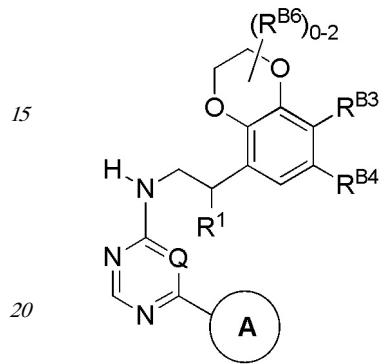
или его фармацевтически приемлемая соль.

45 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



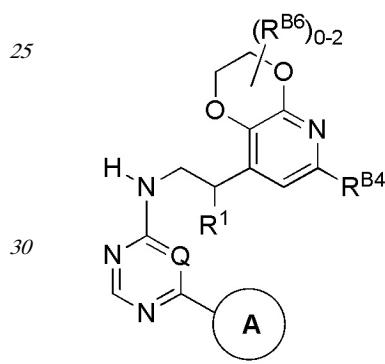
10 или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



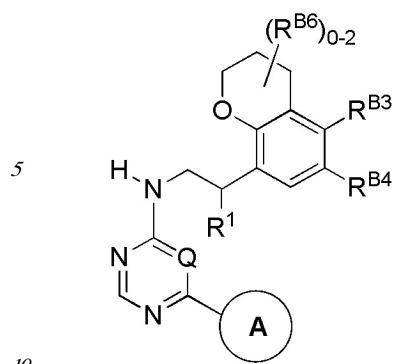
или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:

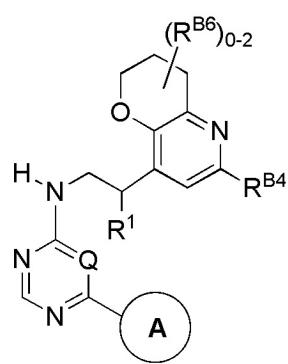


или его фармацевтически приемлемая соль.

35 В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

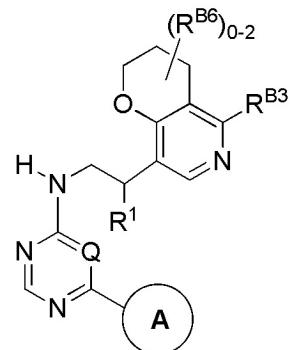


(B-I-B-17),



(B-I-B-18) или

15



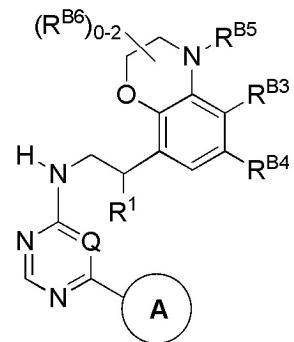
(B-I-B-19),

20

или его фармацевтически приемлемая соль.

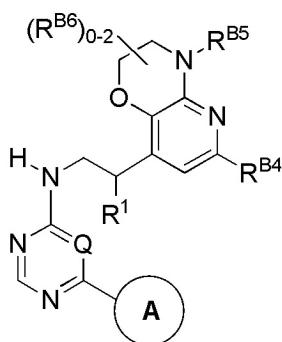
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

25



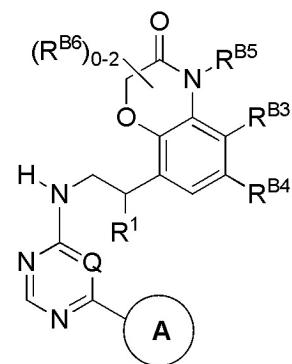
(B-I-B-20),

30



(B-I-B-21) или

35



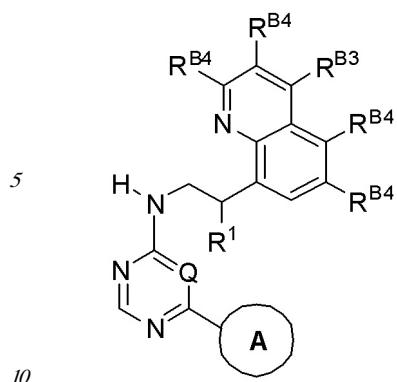
(B-I-B-22),

40

или его фармацевтически приемлемая соль.

45

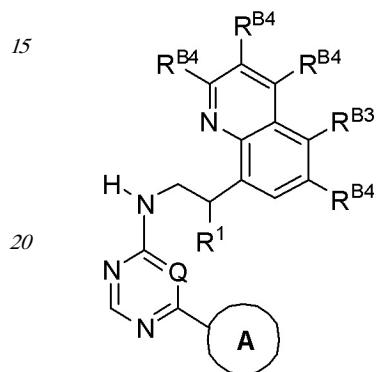
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение следующей формулы:



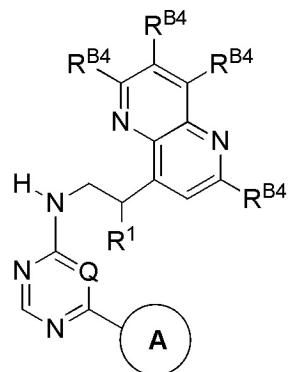
(B-I-B-23),

или его фармацевтически приемлемая соль.

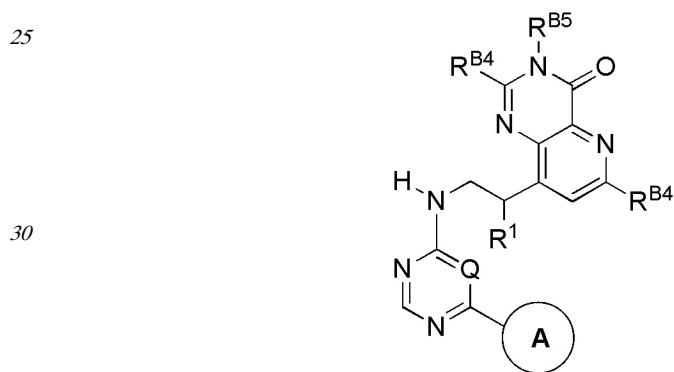
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



(B-I-B-24),



(B-I-B-25) или



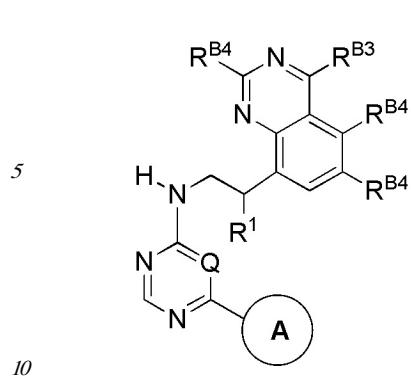
(B-I-B-26),

или его фармацевтически приемлемая соль.

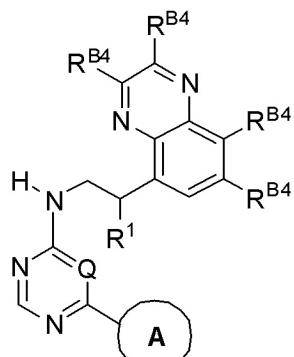
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

40

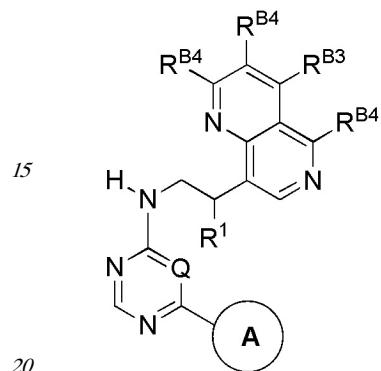
45



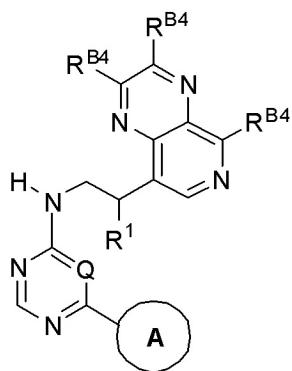
(B-I-B-27),



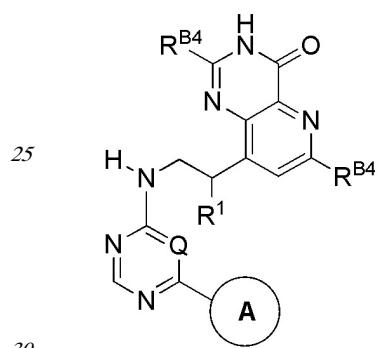
(B-I-B-28),



(B-I-B-29),



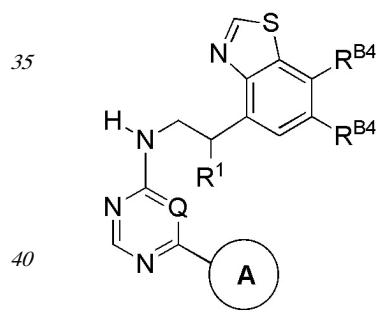
(B-I-B-30) или



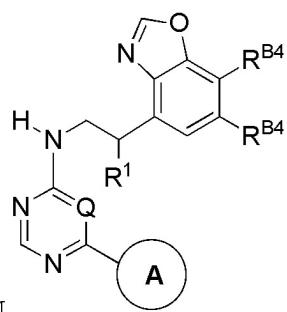
(B-I-B-31),

или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



(B-I-B-32) или

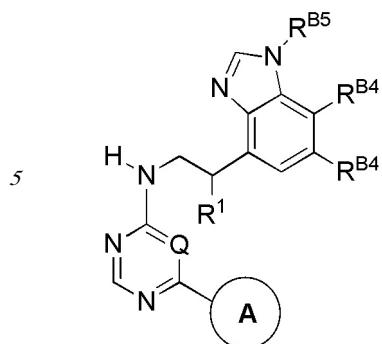


(B-I-B-33),

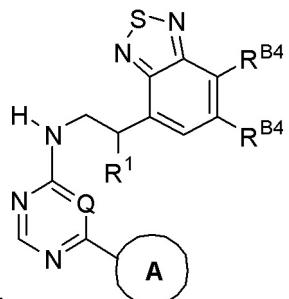
или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

45



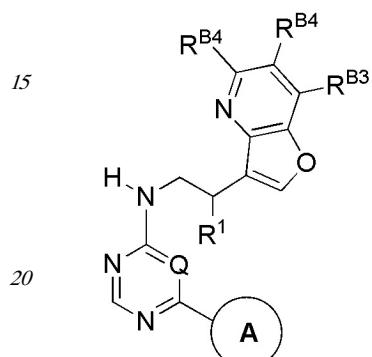
(B-I-B-34) или



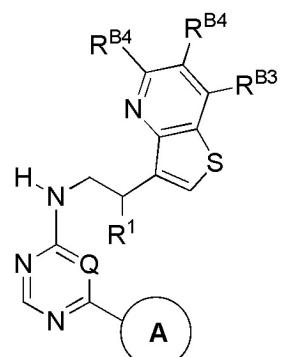
(B-I-B-35),

10 или его фармацевтически приемлемая соль.

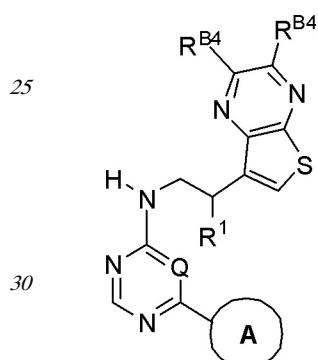
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:



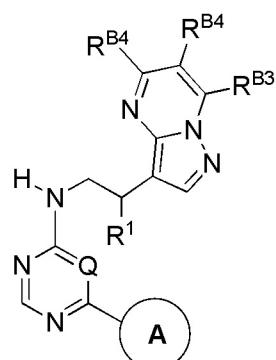
(B-I-B-36),



(B-I-B-37),



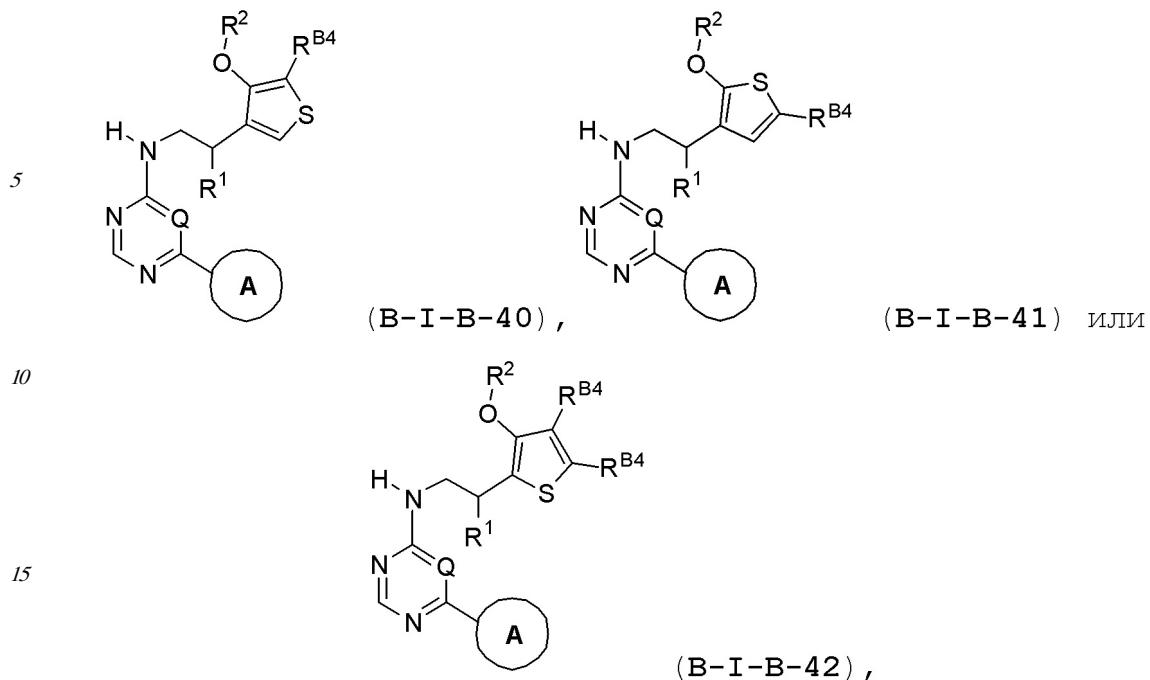
(I-B-38) или



(I-B-39),

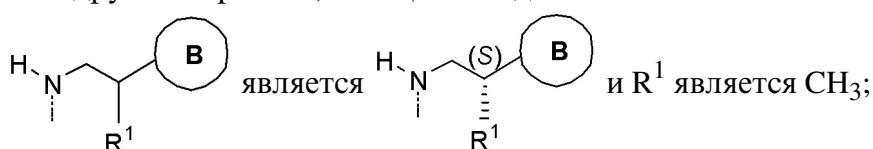
или его фармацевтически приемлемая соль.

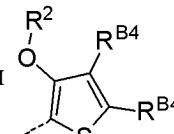
В одном варианте, ингибитором ДНК-ПК является соединение одной из следующих формул:

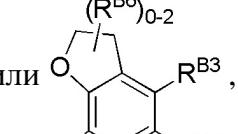


или его фармацевтически приемлемая соль.

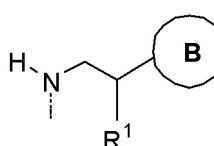
20 В другом варианте, кольцо В соединения связано с остатком молекулы, где

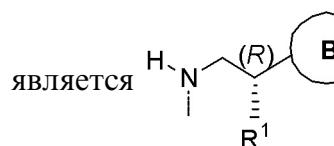


25 за исключением того, когда кольцо В является 

или 

где

30 

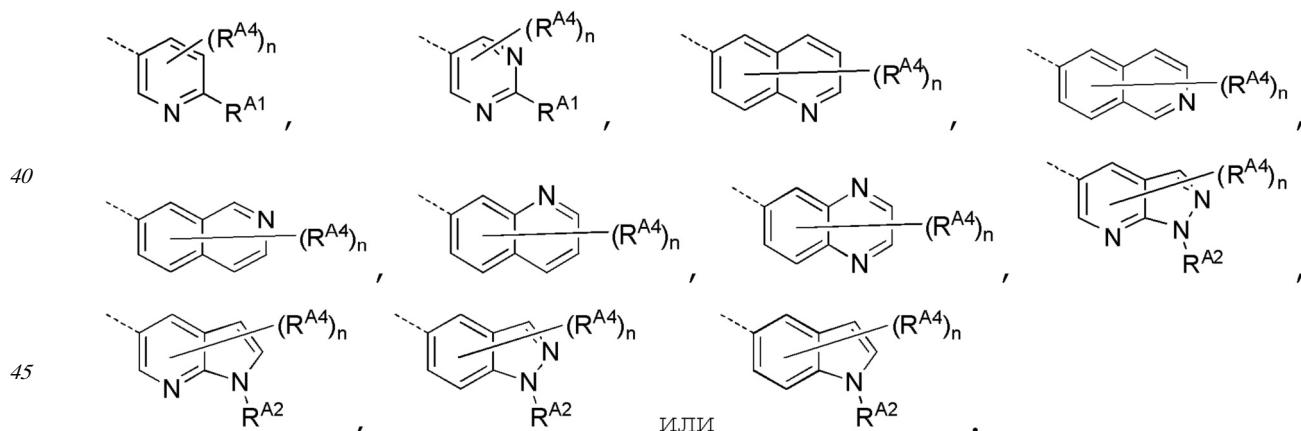
является 

и R¹ является CH₃.

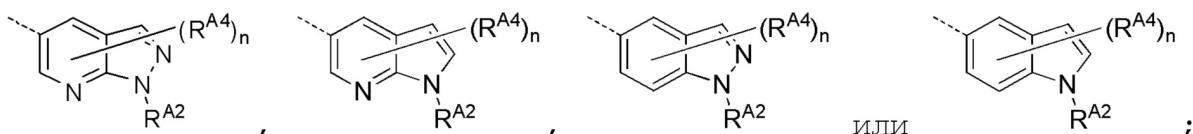
В другом варианте, Q является CH.

В другом варианте, кольцо А содержит гетероциклическое или гетероарильное кольцо.

35 В другом варианте, кольцо А является:



В еще одном варианте, кольцо А является:



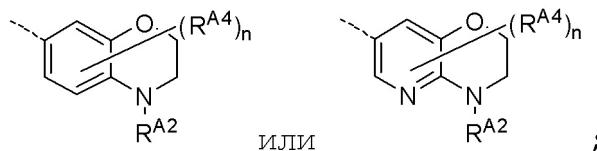
5 где:

R^{A2} является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{0-2} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-2} алкил-(4-6-членным)гетероцикликом, C_{2-4} алкил- OR^{A2a} , C_{0-2} алкил- $C(O)N(R^{A2a})_2$, C_{0-2} алкил- $S(O)_2-C_{1-4}$ алкилом или C_{0-2} алкил- $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, где каждый из указанных 10 гетероциклических соединений выбирают из оксетан-2-ила, азетидин-2-ила, пиперидин-4-ила и 1,1-диоксотиетан-2-ила, и каждая из указанных групп R^{A2} необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, вплоть до двух 15 раз, OR^{A2b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A2b})_2$ группой, $C(O)R^{A2b}$ группой, $C(O)OR^{A2b}$ группой, $C(O)N(R^{A2b})_2$ группой или -CN группой;

каждый R^{A2a} независимо является H, C_{1-4} алкилом, или два R^{A2a} и атом азота между 20 ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила, пиперидинонила, тетрагидропиридинила, пiperазинила и морфолинила;

каждый R^{A2b} независимо является H или C_{1-4} алкилом; и
n равно 0.

В еще одном варианте, кольцо A является:



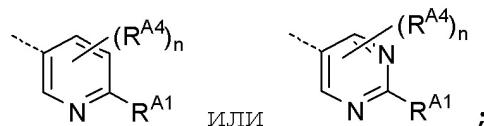
25 где:

R^{A2} является водородом, C_{1-4} алкилом, C_{0-2} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-2} алкил-(4-6-членным)гетероцикликом, C_{2-4} алкил- OR^{A2a} , C_{0-2} алкил- $C(O)N(R^{A2a})_2$, C_{0-2} алкил- $S(O)_2-C_{1-4}$ алкилом или C_{0-2} алкил- $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, где каждый из указанных 30 гетероциклических соединений выбирают из оксетан-2-ила, азетидин-2-ила, пиперидин-4-ила и 1,1-диоксотиетан-2-ила, и каждая из указанных R^{A2} групп необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами, вплоть до двух 35 раз, OR^{A2b} группами, C_{0-2} алкил- $N(R^{A2b})_2$ группами, $C(O)R^{A2b}$ группой, $C(O)OR^{A2b}$ группой, $C(O)N(R^{A2b})_2$ группой или -CN группой;

каждый R^{A2a} независимо является H, C_{1-4} алкилом, или два R^{A2a} и атом азота между 40 ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила, пиперидинонила, тетрагидропиридинила, пiperазинила и морфолинила;

каждый R^{A2b} независимо является H или C_{1-4} алкилом; и
n равно 0.

В еще одном варианте, кольцо A является:



5 где:

R^{A1} является C_{1-4} алкилом, C_{0-4} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-4} алкил- OR^{A1a} ,

C_{0-4} алкил- C_{3-6} циклоалкилом, C_{0-4} алкил- $N(R^{A1a})_2$, $N(R^{A1a})C_{2-4}$ алкил- $N(R^{A1a})_2$, где каждый из указанных R^{A1} алкилов и циклоалкилов необязательно замещен вплоть до трех раз

10 атомами F, вплоть до трех раз атомами 2H или вплоть до двух раз, C_{0-2} алкил- OR^{A1b} группами;

каждый R^{A1a} независимо является водородом, C_{1-4} алкилом, $C(O)R^{A1b}$ группой или 15 два R^{A1a} и атом азота между ними образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо, выбранное из азиридинила, азетидинила, пирролидинила, пирролидинонила, пиперидинила, пиперидинонила, тетрагидропиридинила, пиперазинила и морфолинила, где каждая из указанных алкильных и гетероциклических групп R^{A1a} необязательно замещена вплоть до трех раз атомами F, вплоть до двух раз, C_{1-2} алкильными группами,

20 вплоть до двух раз, OR^{A1b} группами или -CN группой;

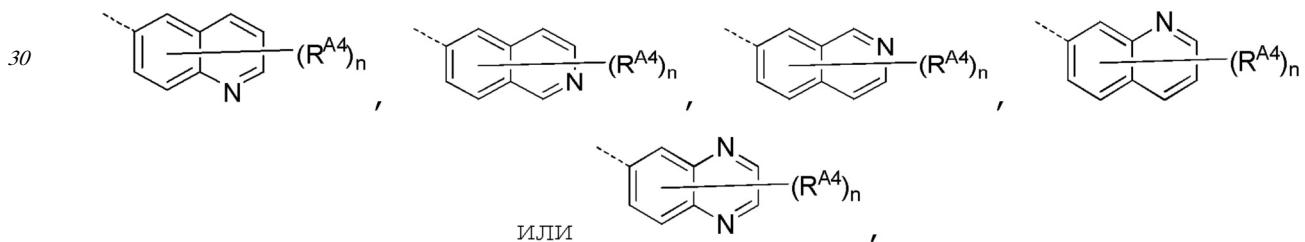
каждый R^{A1b} независимо является водородом или C_{1-2} алкилом; каждый R^{A4}

независимо является галогеном, 2H , C_{1-4} алкилом, $N(R^{1a})_2$ или OC_{1-4} алкилом, где каждый

25 R^{A4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом; и

п равно 0, 1, 2 или 3.

В еще одном варианте, кольцо A является:



35 где:

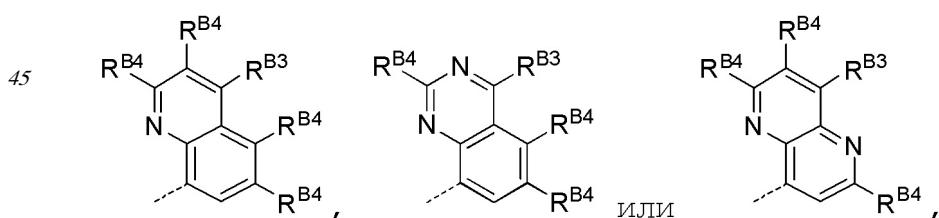
каждый R^{A4} независимо является галогеном, C_{1-4} алкилом или OC_{1-4} алкилом, где

каждый R^{A4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом, и

40 п равно 0, 1 или 2.

В другом варианте, кольцо B содержит гетероциклическое или гетероарильное кольцо.

В одном варианте, кольцо B является:



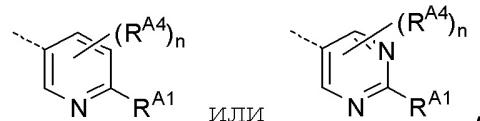
где:

5 R^{B3} является $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом, где указанный алкил необязательно замещен вплоть до трех раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом;

каждый R^{B4} независимо является водородом, 2H , F, C_{1-4} алкилом или OC_{1-4} алкилом,

где каждый R^{B4} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом.

10 В другом варианте, кольцо A является:



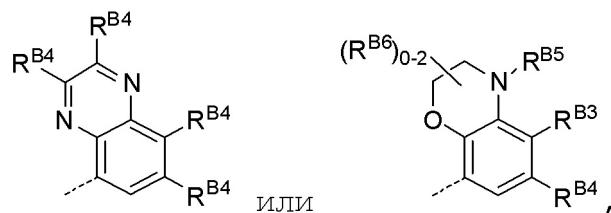
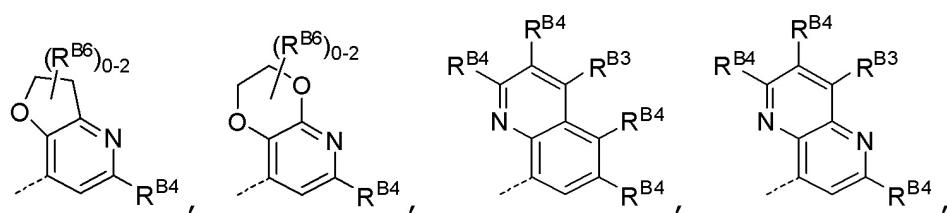
где:

15 R^{A1} является F, C_{1-4} алкилом, OC_{1-4} алкилом, OC_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкилом, NH_2 , NHC_{1-4} алкилом, NHC_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкилом или C_{0-4} алкилгетероцикликом, где указанную гетероциклическую систему колец выбирают из оксетанила, тетрагидрофуранила, тетрагидропирина и морфолинила, и каждый из указанного 20 алкила, циклоалкила и гетероциклила необязательно замещен вплоть до трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами 2H , вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом;

каждый R^{A4} независимо является F, 2H , OC_{1-4} алкилом или NH_2 ; и

25 н равно 0, 1 или 2.

В другом варианте, кольцо B является:



где:

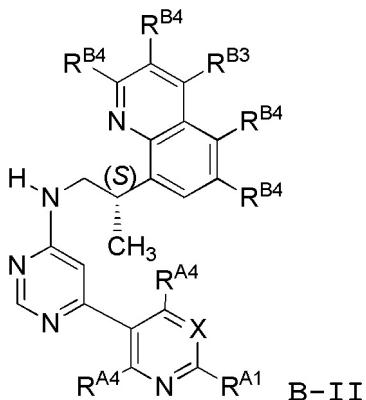
40 каждый из R^{B3} и R^{B4} независимо является водородом, галогеном или C_{1-4} алкилом, где каждый из указанных R^{B3} и R^{B4} алкилов необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, двумя не геминальными OH группами или одним OC_{1-2} алкилом;

R^{B5} является водородом, C_{1-4} алкилом, $C(O)C_{1-4}$ алкилом, $C(O)OC_{1-4}$ алкилом, $C(O)$

45 NH_2 , $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом или $C(O)N(C_{1-4}$ алкилом) $_2$, где указанный R^{B5} алкил необязательно замещен вплоть до 3 раз атомами F, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом; и

R^{B6} является F или C_{1-2} алкилом, или два R^{B6} и атома углерода между ними образуют спироциклическое или спироциклоалкильное кольцо.

В другом аспекте, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-II):



или его фармацевтически приемлемая соль,

где:

X является N или CR^{A5} ;

R^{A1} является F, C_{1-4} алкилом, C_{3-5} циклоалкилом, OC_{1-4} алкилом,

или C_{0-4} алкилгетероциклическую систему выбирают из оксетанила, тетрагидрофурина, тетрагидропирана и морфолинила, и каждый из указанных алкила, циклоалкила и гетероциклической системы необязательно замещен вплоть до

трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами 2H , вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом;

каждый R^{A4} независимо является H или 2H ;

R^{A5} является водородом, F, C_{1-4} алкилом или OC_{1-4} алкилом, где каждый из указанных

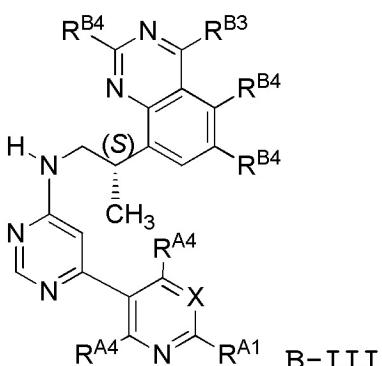
алкилов необязательно замещен вплоть до трех раз атомами F или вплоть до трех раз атомами 2H ;

R^{B3} является $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом, где указанный алкил необязательно замещен

вплоть до трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами 2H , вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC_{1-2} алкилом; и

каждый R^{B4} независимо является водородом,дейтерием, F или C_{1-4} алкилом.

В другом аспекте, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-III):



или его фармацевтически приемлемая соль,

где:

Х является N, CR^{A5};

R^{A1} является F, C₁₋₄алкилом, C₃₋₅циклоалкилом, OC₁₋₄алкилом,

5 OC₁₋₄алкил-C₃₋₅циклоалкилом, NH₂, NHC₁₋₄алкилом, NHC₀₋₄алкил-C₃₋₅циклоалкилом или C₀₋₄алкилгетероцикликом, где указанную гетероциклическую систему выбирают из оксетанила, тетрагидроурина, тетрагидропирана и морфолинила, и каждый из указанных алкила, циклоалкила и гетероциклила необязательно замещен вплоть до 10 трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами ²H, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC₁₋₂алкилом;

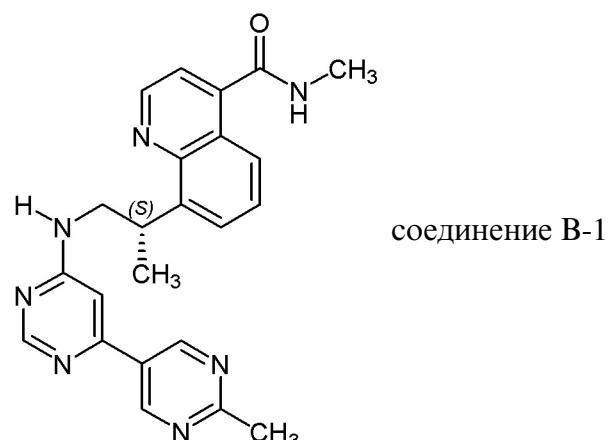
каждый R^{A4} независимо является H или ²H;

15 R^{A5} является водородом, F, C₁₋₄алкилом или OC₁₋₄алкилом, где каждый из указанных алкилов необязательно замещен вплоть до трех раз атомами F или вплоть до трех раз атомами ²H;

20 R^{B3} является C(O)NHC₁₋₄ алкилом, где указанный алкил необязательно замещен вплоть до трех раз атомами F, вплоть до трех раз атомами ²H, вплоть до двух раз, не геминальными OH группами или вплоть до двух раз, OC₁₋₂алкилом; и

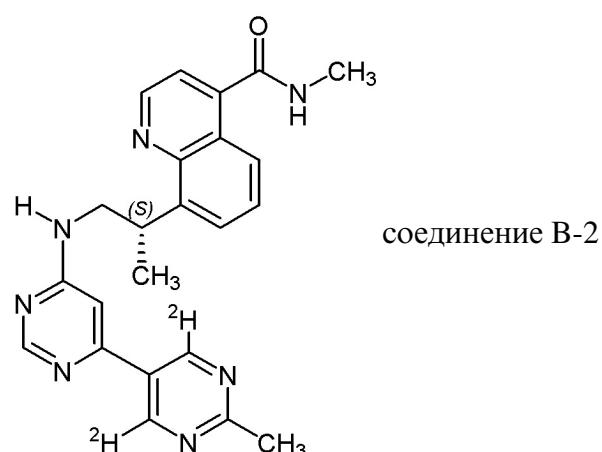
каждый R^{B4} независимо является водородом, дейтерием, F или C₁₋₄алкилом.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение B-1:



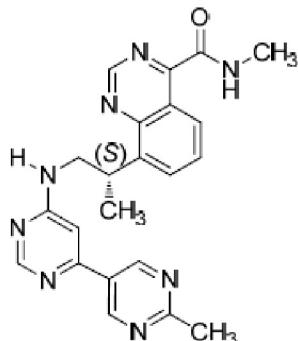
или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение B-2:



или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение В-3:



соединение В-3

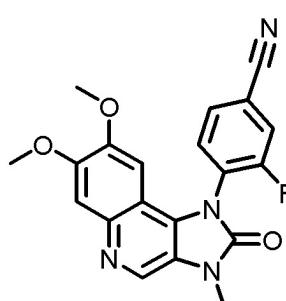
или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте, ингибитор ДНК-ПК выбирают из соединения, описанного в WO

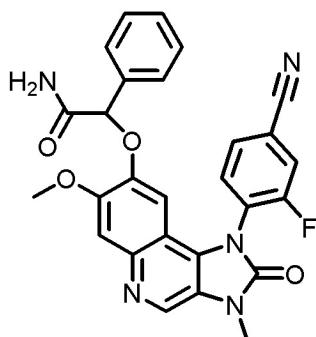
2013/163190, WO2015/058031, WO2014/159690 и/или WO2015/058067. В определенных

15 вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-I), (B-II) или (B-III). В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение В-1, соединение В-2 или соединение В-3.

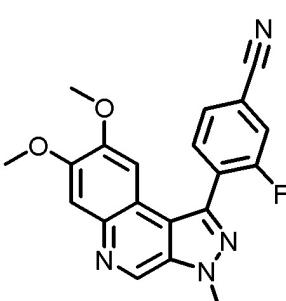
В другом варианте, ингибитор ДНК-ПК выбирают из соединения, описанного в WO 2012/000632 или US 2013/0172337, например, такого как



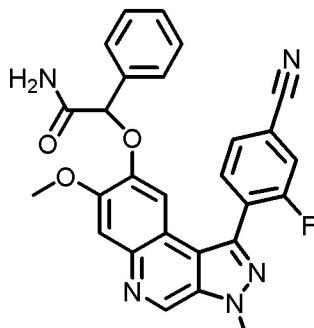
соединение С-1,



соединение С-2,



соединение С-3 и/или



соединение С-4.

30 В другом варианте, ингибитором ДНК-ПК является СС-115 (5-этил-3-[2-метил-6-(1Н-1,2,4-триазол-5-ил)пиридин-3-ил]-7,8-дигидропиразино[2,3-б]пиразин-6-он).

35 40 В целях этой заявки, должно быть понятно, что термины вариант, пример и аспект применяют взаимозаменяямо.

45 Для целей этой заявки, должно быть понятно, что термины ДНК-ПК, ДНК-ПК_п (катализическая подъединица ДНК-зависимой протеинкиназы), ДНК протеинкиназа, ДНК-зависимая протеинкиназа и подобные применяют взаимозаменяямо. Ингибитор ДНК-ПК соединение, которое ингибирует ДНК-ПК и подобные также применяют взаимозаменяямо.

Должно быть понятно специалисту в данной области техники, что стрелка в →O представляет семиполярную связь.

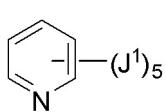
Эта заявка относится к различным выданным патентам, опубликованным заявкам на патент, журнальным статьям и другим публикациям, все которые включены сюда в качестве ссылки.

Соединения включают те, которые описаны здесь, и также иллюстрированы классами, подклассами и видами, описанными здесь. В данном описании необходимо применять следующие определения, если не указано иначе. Химические элементы идентифицируют согласно Периодической таблице элементов, версия CAS, *Handbook of Chemistry and Physics*, 75th Ed. Дополнительно, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999 и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено сюда в качестве ссылки.

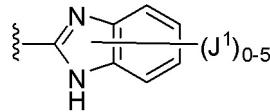
Как описано здесь, указанный численный интервал атомов включает любое целое число внутри него. Например, группа, имеющая 1-4 атома может иметь 1, 2, 3 или 4 атома.

Как описано здесь, соединения необязательно могут быть замещены одним или более заместителями, такими как иллюстрированы в общем здесь, или представленными определенными классами, подклассами и видами. Должно быть понятно, что фраза "необязательно замещен" применяется взаимозаменяя с фразой "замещен или не замещен". В общем, термин "замещенный", применяется ли он с термином "необязательно" или нет, относится к замещению водородных радикалов в данной структуре радикалом определенного заместителя. Если не указано иначе, необязательно замещенная группа может иметь заместитель в каждом замещаемом положении группы, и если более одного положения в любой данной структуре может быть замещено более чем одним заместителем, выбранным из определенной группы, заместители могут быть одинаковыми или разными в каждом положении. Предполагаемые сочетания заместителей предпочтительно такие, которые дают образование стабильных или химически вероятных соединений.

Если не указано иначе, заместитель, связанный связью, нарисованной из центра кольца, означает, что заместитель может быть связан с любым положением кольца. В примере i ниже, например, J¹ может быть связан с любым положением пиридильного кольца. Для бициклических колец, связь, нарисованная через оба кольца, означает, что заместитель может быть связан с любым положением бициклического кольца. В примере ii ниже, например, J¹ может быть связан с 5-членным кольцом (на атоме азота, например) и с 6-членным кольцом.



i



ii

Термин "стабильное" в данном описании относится к соединениям, которые по существу не изменяются в условиях их получения, определения, восстановления, очистки и применения для одной или более целей, описанных здесь. В некоторых вариантах, стабильным соединением или химически возможным соединением является такое, которое по существу не изменяется при хранении при температуре 40°C или менее, в отсутствие влаги или других реакционноспособных условий, в течение, по крайней мере, недели.

Термин "семиполярная связь" в данном описании определен как координационная

связь, образованная при взаимодействии между молекулярными видами, один из которых служит в качестве донора, и другой в качестве акцептора электронной пары, которая будет разделена в образованном комплексе.

Термин "алифатическое" или "алифатическая группа" в данном описании означает

5 прямую (т.е., неразветвленную), разветвленную или циклическую, замещенную или не замещенную углеводородную цепь, которая полностью насыщена или которая содержит одну или более единиц ненасыщенности, которые имеют одну точку присоединения к остатку молекулы.

Если не указано иначе, алифатические группы содержат 1-20 алифатических атомов

10 углерода. В некоторых вариантах, алифатические группы содержат 1-10 алифатических атомов углерода. В других вариантах, алифатические группы содержат 1-8

алифатических атомов углерода. В других вариантах, алифатические группы содержат 1-6 алифатических атомов углерода, и в еще других вариантах, алифатические группы

15 содержат 1-4 алифатических атома углерода. Алифатические группы могут быть

линейными или разветвленными, замещенными или не замещенными алкильными, алкенильными или алкинильными группами. Определенные примеры включают, но не

ограничены ими, метил, этил, изопропил, н-пропил, втор-бутил, винил, н-бутенил,

этинил и трет-бутил. Алифатические группы также могут быть циклическими, или иметь

20 сочетание линейных или разветвленных и циклических групп. Примеры таких типов алифатических групп включают, но не ограничены ими, циклопропил, циклобутил,

цикlopентил, циклогексил, циклогексенил, -CH₂-циклопропил, -CH₂CH₂CH(CH₃)-

циклогексил.

Термин "циклоалифатический" (или "карбоцикл" или "карбоциклиз") относится к

25monoциклическому C₃-C₈ углеводороду или бициклическому C₈-C₁₂ углеводороду,

который полностью насыщен или который содержит одну или более единиц

ненасыщенности, но который не является ароматическим, который имеет одну точку

присоединения к остатку молекулы, где любое отдельное кольцо в указанном

бициклической системе колец имеет 3-7 членов. Примеры циклоалифатических групп

включают, но не ограничены ими, циклоалкильные и циклоалкенильные группы.

30 Определенные примеры включают, но не ограничены ими, циклогексил, циклопропенил и циклобутил.

Термин "гетероцикл", "гетероциклиз" или "гетероциклический" в данном описании

означает не ароматические, моноциклические, бициклические или трициклические

35 системы колец, в которых один или более членов кольца являются независимо

выбранными гетероатомами. В некоторых вариантах, "гетероцикл", "гетероциклиз"

или "гетероциклическая" группа имеет от трех до четырнадцати членов в кольце, в

котором один или более членов кольца являются гетероатомом, независимо выбранным

из кислорода, серы, азота и фосфора, и каждое кольцо в системе содержит 3-7 членов

в кольце.

40 Примеры гетероциклов включают, но не ограничены ими, 3-1Н-бензимидазол-2-он,

3-(1-алкил)бензимидазол-2-он, 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-

тетрагидротиофенил, 3-тетрагидротиофенил, 2-морфолино, 3-морфолино, 4-морфолино,

2-тиоморфолино, 3-тиоморфолино, 4-тиоморфолино, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил,

3-пирролидинил, 1-тетрагидропиразинил, 2-тетрагидропиразинил, 3-

45 тетрагидропиразинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 1-пиразолинил,

3-пиразолинил, 4-пиразолинил, 5-пиразолинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-

пиперидинил, 4-пиперидинил, 2-тиазолидинил, 3-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 1-

имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, 5-имидазолидинил, индолинил,

тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, бензотиолан, бензодитиан и 1,3-дигидроимидазол-2-он.

Циклические группы (например, циклоалифатические и гетероциклы) могут быть линейными, конденсированными, мостиковыми или спироциклическими.

5 Термин "гетероатом" означает один или более из кислорода, серы, азота, фосфора или кремния (включая любые окисленные формы азота, серы, фосфора или кремния; кватернизованные форму любого основного азота или; замещаемый азот гетероциклического кольца, например N (как в 3,4-дигидро-2Н-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR⁺ (как в N-замещенном пирролидиниле)).

10 Термин "ненасыщенное" в данном описании означает, что группа имеет одну или более единиц ненасыщенности. Как известно специалисту в данной области техники, ненасыщенные группы могут быть частично ненасыщены или полностью ненасыщены. Примеры частично ненасыщенных групп включают, но не ограничены ими, бутен, циклогексен и тетрагидропиридин. Полностью ненасыщенные группы могут 15 быть ароматическими, анти-ароматическими или не ароматическими. Примеры полностью ненасыщенных групп включают, но не ограничены ими, фенил, циклооктатетраен, пиридин, тиенил и 1-метилпиридин-2(1Н)-он.

20 Термин "алкокси" или "тиоалкил" в данном описании относится к алкильной группе, такой как определена выше, присоединенной через атом кислорода ("алкокси") или серы ("тиоалкил").

25 Термины "галоалкил", "галоалкенил", "галоалифатическое" и "галоалкокси" означает алкил, алкенил или алкокси, в зависимости от обстоятельств, замещенный одним или более атомами галогена. Этот термин включает перфторированные алкильные группы, такие как -CF₃ и -CF₂CF₃.

25 Термины "галоген", "гало" и "гал" означают F, Cl, Br или I.

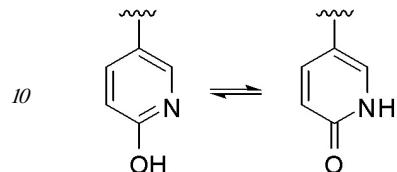
Термин "арил" отдельно или как часть большей группы, такой как "аралкил", "аралкокси" или "арилоксиалкил", относится к моноциклическим, бициклическим и трициклическим системам колец, имеющим всего от пяти до четырнадцати членов в кольце, где, по крайней мере, одно кольцо в системе является ароматическим, и где каждое кольцо в системе содержит 3-7 членов в кольце. Термин "арил" может применяться взаимозаменяя с термином "арильное кольцо".

35 Термин "гетероарил", применяемый отдельно или как часть большей группы, такой как "гетероаралкил" или "гетероарилалкокси", относится к моноциклической, бициклической и трициклической системам колец, имеющим всего от пяти до четырнадцати членов в кольце, где, по крайней мере, одно кольцо в системе является ароматическим, по крайней мере, одно кольцо в системе содержит один или более гетероатомов, и где каждое кольцо в системе содержит 3-7 членов в кольце. Термин "гетероарил" может применяться взаимозаменяя с термином "гетероарильное кольцо" или термином "гетероароматическое". Примеры гетероарильных колец включают, но не ограничены ими, 2-фуранил, 3-фуранил, N-имидаолил, 2-имидаолил, 4-имидаолил, 5-имидаолил, бензимидаолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил, N-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 2-пиридинил, 3-пиридинил, 4-пиридинил, 5-пиридинил, пиридазинил (например, 3-пиридазинил), 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, тетразолил (например, 5-тетразолил), триазолил (например, 2-триазолил и 5-триазолил), 2-тиенил, 3-тиенил, бензофурил, бензотиофенил, индолил (например, 2-индолил), пиразолил (например, 2-пиразолил), изотиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, пуринил,

пиразинил, 1,3,5-триазинил, хинолинил (например, 2-хинолинил, 3-хинолинил, 4-хинолинил) и изохинолинил (например, 1-изохинолинил, 3-изохинолинил или 4-изохинолинил).

Должно быть понятно, что термин "гетероарил" включает определенные типы

5 гетероарильных колец, которые существуют в равновесии между двумя разными формами. Более конкретно, например, такие виды, как гидропиридин и пиридинон (а также гидроксипиридин и пиридинон) включены в определение "гетероарил".



Термин "защищающая группа" и "защитная группа" в данном описании являются взаимозаменяемыми и относятся к агенту, применяемому для временной блокировки 15 одной или более желательных функциональных групп в соединении с множеством реакционноспособных мест. В определенных вариантах, защитная группа имеет одну или более, или предпочтительно все, следующие характеристики: а) добавляют селективно к функциональной группой с хорошим выходом для получения защищенного 20 субстрата, который б) устойчив к реакциям, возникающим в одном или более других реакционноспособных мест; и с) селективно удаляют с хорошим выходом реагентами, которые не атакуют регенерированную, со снятой защитой функциональную группу. Как понятно специалисту в данной области техники, в некоторых случаях, реагенты 25 не атакуют другие реакционноспособные группы в соединении. В других случаях, реагенты также могут взаимодействовать с другими реакционноспособными группами в соединении. Примеры защитных групп более подробно описаны в Greene, T.W., Wuts, P. G in "Protective Groups in Organic Synthesis", Third Edition, John Wiley & Sons, New York: 1999 (и других изданиях книги), полное содержание которого включено сюда в качестве ссылки. Термин "азотная защитная группа" в данном описании относится к агенту, 30 применяемому для временной блокировки одного или более желаемых азотных реакционноспособных мест в многофункциональном соединении. Предпочтительные азотные защитные группы также обладают характеристиками, представленными для 35 описанной выше защитной группы, и определенные типовые азотные защитные группы также подробно описаны в главе 7 Greene, T.W., Wuts, P. G in "Protective Groups in Organic Synthesis", Third Edition, John Wiley & Sons, New York: 1999, полное содержание которой включено сюда в качестве ссылки.

В некоторых вариантах, метиленовая единица алкильной или алифатической цепи необязательно замещена другим атомом или группой. Примеры таких атомов или групп включают, но не ограничены ими, азот, кислород, серу, -C(O)-, -C(=N-CN)-, -C(=NR)-, -C(=NOR)-, -SO- и -SO₂- . Эти атомы или группы могут быть объединены с 40 получением больших групп. Примеры таких больших групп включают, но не ограничены ими, -OC(O)-, -C(O)CO-, -CO₂-, -C(O)NR-, -C(=N-CN), -NRCO-, -NRC(O)O-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -NRC(O)NR-, -OC(O)NR- и -NRSO₂NR-, где R является, например, H или C₁₋₆алифатическим. Должно быть понятно, что эти группы могут быть связаны с 45 метиленовыми единицами алифатической цепи через одинарную, двойную или тройную связь. Примером необязательного замещения (атома азота в этом случае), которое связано с алифатической цепью через двойную связь, может быть -CH₂CH=N-CH₃. В некоторых случаях, особенно на конце, необязательное замещение может быть связано

с алифатической группой через тройную связь. Одним из примеров является $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$. Должно быть понятно, что в этой ситуации концевой азот не связан с другим атомом.

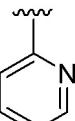
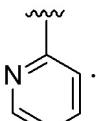
Также должно быть понятно, что термин "метиленовая единица" также может относиться к разветвленной или замещенной метиленовой единице. Например, в изопропиловой группе $[-\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$, атом азота (например, NR), замещающий первую указанную "метиленовую единицу" дает диметиламин $[-\text{N}(\text{CH}_3)_2]$. В таких случаях специалист в данной области техники поймет, что атом азота не будет иметь каких-либо дополнительных атомов, связанных с ним, и "R" из "NR" будет отсутствовать в этом случае.

"Пэгилирование" или "пэгилированный" относится к способу ковалентного и не ковалентного присоединения или амальгамирования полиэтиленгликоловой (ПЭГ, в фармацевтике называется макроголь) полимерной цепи до молекул и макроструктур, таких как лекарственное средство, терапевтический белок или везикула/липосома. "Не пэгилирование" или "не пэгилированный" относится к отсутствию ПЭГ.

Если не указано иначе, необязательные замещения образуют химически стабильное соединение. Необязательные замещения могут возникать в цепи и/или на любом конце цепи; т.е. в месте присоединения и/или также на концах. Два необязательных замещения также могут быть соседними друг с другом внутри цепи, пока это дает химически стабильное соединение. Например, C_3 алифатическая цепь может быть необязательно замещена 2 атомами азота с получением $-\text{C}-\text{N}\equiv\text{N}$. Необязательные замещения также могут полностью замещать все атомы углерода в цепи. Например, C_3 алифатическая цепь может быть необязательно замещена $-\text{NR}-$, $-\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{NR}-$ с получением $-\text{NRC}(\text{O})-\text{NR}-$ (мочевины).

Если не указано иначе, если замещение возникает на конце, замещающий атом связан с атомом водорода на конце. Например, если метиленовая единица $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ необязательно замещена $-\text{O}-$, полученным соединением может быть $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Должно быть понятно, что если концевой атом не содержит свободных валентных электронов, то атом водорода не требуется на конце (например, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{O}$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$).

Если не указано иначе, изображенные здесь структуры также включают все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные, геометрические, конформационные и ротационные) формы структуры. Например, R и S конфигурации для каждого асимметричного центра, (Z) и (E) изомеры двойной связи и (Z) и (E) конформационные изомеры рассматриваются здесь. Как должно быть понятно специалисту в данной области техники, заместитель может свободно вращаться вокруг любой вращаемой

связи. Например, заместитель, изображенный как  также представляет .

Отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные, геометрические, конформационные и ротационные смеси данных соединений рассматриваются здесь.

Если не указано иначе, все таутомерные формы описанных соединений рассматриваются здесь.

В одном варианте, описанное здесь соединение представлено в форме одного энантиомера, по крайней мере, на 95%, по крайней мере, на 97% и, по крайней мере, на

99% не содержит соответствующего энантиомера.

В другом варианте, описанное здесь соединение имеет форму (+) энантиомера, по крайней мере, на 95% не содержащего соответствующий (-) энантиомер.

В другом варианте, описанное здесь соединение имеет форму (+) энантиомера, по

5 крайней мере, на 97% не содержащего соответствующий (-) энантиомер.

В другом варианте, описанное здесь соединение имеет форму (+) энантиомера, по крайней мере, на 99% не содержащего соответствующий (-) энантиомер.

В другом варианте, описанное здесь соединение имеет форму (-) энантиомера, по крайней мере, на 95% не содержащего соответствующий (+) энантиомер.

10 В другом варианте, описанное здесь соединение имеет форму (-) энантиомера, по крайней мере, на 97% не содержащего соответствующий (+) энантиомер.

В другом варианте, описанное здесь соединение имеет форму (-) энантиомера, по крайней мере, на 99% не содержащего соответствующий (+) энантиомер.

Дополнительно, если не указано иначе, изображенные здесь структуры также

15 включают соединения, которые отличаются только присутствием одного или более изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие данные структуры, за исключением замещения водорода дейтерием или тритием, или замещения углерода ^{13}C - или ^{14}C -обогащенным углеродом, рассматриваются здесь. Такие соединения применяют, например, в качестве аналитических инструментов или проб в биологических 20 исследованиях.

ДНК-поражающие агенты

В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент содержит химиотерапию. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-I) (например, Соединение B-1, Соединение B-2 или Соединение B-3, Соединение C-1,

25 Соединение C-2, Соединение C-3 или Соединение C-4, и ДНК-поражающим агентом является химиотерапия. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является СС-115 и ДНК-поражающим агентом является химиотерапия.

В данном описании термин "химиотерапия" не включает радиационную терапию, если не указано. Примеры химиотерапии включают, но не ограничены ими,

30 платинирующие агенты, такие как Карбоплатин, Оксалиплатин, Цисплатин, Недаплатин, Сатраплатин, Лобаплатин, Триплатин, Тетранитрат, Пикоплатин, Пролиндак, Араплатин и другие производные; ингибиторы топоизомеразы I, такие как Камптотецин, Топотекан, Иринотекан/SN38, Рубитекан, Белотекан и другие производные; ингибиторы топоизомеразы II, такие как Этопозид (VP-16), Даунорубицин, доксорубициновый агент (например, доксорубицин, доксорубицин HCl, аналоги доксорубицина или доксорубицин и соли или аналоги в липосомах), Митоксантрон, Акларубицин, Эпирубицин, Идарубицин, Амрубицин, Амсакрин, Пирарубицин, Валрубицин, Зорубицин, Тенипозид и другие производные; антиметаболиты, такие как фолиевое семейство (Метотрексат, Пеметрексед, Ралтитрексед, Аминоптерин и родственные соединения); антагонисты

35 пуринов (Тиогуанин, Флударабин, Кладрибин, 6-Меркаптопурин, Пентостатин, Клофарабин и родственные соединения) и антагонисты пириимида (Цитарабин, Флоксуридин, Азасидидин, Тегафур, Кармофур, Капаситабин, Гемцитабин, гидроксимочевина, 5-Фторурацил(5FU) и родственные соединения); алкилирующие

40 агенты, такие как хлорметины (например, Циклофосфамид, Мелфалан, Хлорамбуцил, Мехлоретамин, Ифосфамид, Мехлоретамин, Трофосфамид, Преднимустин, Бендамустин, Урамустин, Эстрамустин и родственные соединения); нитрозомочевины (например, Кармустин, Ломустин, Семустин, Фотемустин, Нимустин, Ранимустин, Стрептозоцин и родственные соединения); триазены (например, Дакарбазин, Алтретамин, Темозоломид

и родственные соединения); алкилсульфонаты (например, Бусульфан, Манносульфан, Треосульфан и родственные соединения); прокарбазин; митобронитол и азиридины (например, Карбоквон, Триазиквон, ТиоТЭПА, триэтиленмаламин и родственные соединения); антибиотики, такие как антрациклины (например, доксорубициновый агент, даунорубицин, эпирубицин и другие производные); антрацендионы (например, Митоксантрон и родственные соединения); семейство Streptomycetes (например, Блеомицин, Митомицин С, Актиномицин, Пликамицин); и ультрафиолетовый свет.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-I) (например, Соединение B-1, Соединение B-2 или Соединение B-3, Соединение C-1, Соединение C-2, Соединение C-3 или Соединение C-4, и ДНК-поражающий агент содержит химиотерапию. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-I) (например, Соединение B-1, Соединение B-2 или Соединение B-3, Соединение C-1, Соединение C-2, Соединение C-3 или Соединение C-4, и ДНК-поражающим агентом является ингибитор ТороI или ингибитор Торо II, выбранный из группы, включающей Камптотецин, Топотекан, Иринотекан/SN38, Рубитекан, Белотекан, Этопозид, Даунорубицин, доксорубициновый агент, Акларубицин, Эпирубицин, Идарубицин, Амрубицин, Пирарубицин, Валрубицин, Зорубицин и Тенипозид. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (B-I) (например, Соединение B-1, Соединение B-2 или Соединение B-3, Соединение C-1, Соединение C-2, Соединение C-3 или Соединение C-4, и ДНК-поражающим агентом является доксорубицин HCl липосома (например, ПЛД, DOXIL®). В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является Соединение B-1, фармацевтически приемлемая соль Соединения B-1, Соединение B-2 или фармацевтически приемлемая соль Соединения B-2, и ДНК-поражающим агентом является Доксорубицин HCl липосома (например, ПЛД, DOXIL®).

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является СС-115, и ДНК-

поражающий агент включает химиотерапию. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является СС-115, и ДНК-поражающим агентом является ингибитор Торо I или ингибитор Торо II, выбранный из группы, включающей Камптотецин, Топотекан, Иринотекан/SN38, Рубитекан, Белотекан, Этопозид, Даунорубицин, доксорубициновый агент, Акларубицин, Эпирубицин, Идарубицин, Амрубицин, Пирарубицин, Валрубицин, Зорубицин и Тенипозид. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является СС-115 и ДНК-поражающим агентом является доксорубициновый агент. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является СС-115, и ДНК-поражающим агентом является Доксорубицин HCl липосома для инъекций (например, ПЛД, DOXIL®).

В определенных вариантах, описанные здесь способы необязательно могут

применяться в сочетании с радиационной терапией. Примеры радиационной терапии включают, но не ограничены ими, ионизирующее облучение, гамма облучение, радиотерапия нейтронным пучком, радиотерапия электронным пучком, протонная терапия, брахитерапия, системные радиоактивные изотопы и радиосенсибилизаторы. Радиосенсибилизаторы работают различными путями, включающими, но не ограниченными ими, делание раковых клеток более чувствительными к облучению, работа в синергии с облучением для получения улучшенного синергетического эффекта, аддитивное действие с радиацией или защита окружающих здоровых клеток от повреждения, вызванного облучением. В данном описании, термины "в сочетании" или

"совведение" могут применяться взаимозаменямо для обозначения применения более одной терапии (например, одного или более профилактических и/или терапевтических агентов). Применение терминов не ограничивает порядок, в котором терапии (например, профилактические и/или терапевтические агенты) вводят субъекту. В некоторых

5 вариантах, радиационной терапией, которую применяют в сочетании с описанными здесь способами, является ионизирующее облучение. В некоторых вариантах, нуждающегося субъекта облучают радиацией после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, нуждающегося субъекта облучают радиацией от около 10 минут до около 20 минут после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых

10 вариантах, нуждающегося субъекта облучают радиацией около 15 минут после введения ДНК-поражающего агента.

Дозы ДНК-поражающего агента и ингибитора ДНК-ПК

В общем, может вводиться любая эффективная доза ингибитора ДНК-ПК и ДНК-поражающего агента. Могут применяться различные стратегии дозирования (например, 15 плоско-фиксированное дозирование или дозирование на основе поверхности тела), в зависимости от фармакологии применяемого ингибитора ДНК-ПК и ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК, при применении в комбинированной терапии с ДНК-поражающим агентом, как описано здесь, вводят в дозе от около 0,5 мг до около 20 мг, от около 20 мг до около 50 мг, от около 50 мг до 20 около 4000 мг, от около 50 мг до около 3000 мг, от около 50 мг до около 2400 мг, от около 60 мг до около 240 мг, от около 60 мг до около 180 мг, от около 60 мг до около 120 мг, от около 80 мг до около 120 мг, от около 90 мг до около 120 мг, от около 80 мг до около 100 мг, или от около 120 мг до около 2000 мг. В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК вводят в количестве около 60 мг, 120 мг, 240 мг или 480 мг. В 25 некоторых вариантах, различные представленные выше варианты применимы для Соединения В-1 или Соединения В-2, включая их соли и сокристаллы, в описанных здесь способах.

В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК, при применении в комбинированной терапии с ДНК-поражающим агентом, как описано здесь, вводят в дозе от около 50 мг/м² до около 300 мг/м², от около 50 мг/м² до около 240 мг/м², от около 60 мг/м² до около 240 мг/м², от около 60 мг/м² до около 180 мг/м², от около 60 мг/м² до около 120 мг/м², от около 80 мг/м² до около 120 мг/м², от около 90 мг/м² до около 120 мг/м² или от около 80 мг/м² до около 100 мг/м². В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК 35 может вводиться в дозе от около 20 мг/м² до около 300 мг/м² (например, около 240 мг/м²). В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе от около 20 мг/м² до около 100 мг/м² (например, около 40 или 50 мг/м²). В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе от около 20 мг/м² до около 50 мг/м² (например, около 40 или 50 мг/м²). В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе около 30, 40 или 50 мг/м². В некоторых случаях, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе от около 60 мг/м² до около 180 мг/м² (например, 120 мг/м²). В определенных случаях, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе от около 80 мг/м² до около 100 мг/м² (например, около 90 мг/м²). В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе около 90 мг/м² или около 120 мг/м².

В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент, при применении в

комбинированной терапии с ингибитором ДНК-ПК, как описано здесь, вводят в дозе 50 мг/м² каждые 4 недели в течение 4 циклов минимум, вводят в дозе 30 мг/м² каждые 3 недели, или вводят в дозе 30 мг/м² в день 4 после бортезомиба, который вводят в дозе 5 1,3 мг/м² в дни 1, 4, 8 и 11, каждые 3 недель. В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент, при применении в комбинированной терапии с ингибитором ДНК-ПК, как описано здесь, вводят в дозе от около 20 до около 100 мг/м² (например, около 40 или 50 мг/м²). В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в дозе от около 10 20 мг/м² до около 60 мг/м² (например, около 40 или 50 мг/м²). В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в дозе около 30, 40 или 50 мг/м². В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в дозе около 40 мг/м². В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в дозе около 50 мг/м². В некоторых 15 вариантах, представленные выше варианты применимы к доксорубициновым агентам (например, гидрохлориду доксорубицина или пэгилированному микросомальному доксорубицину).

В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент, при применении в комбинированной терапии с ингибитором ДНК-ПК, как описано здесь, может вводиться 20 при целевой ППК от около 3 до около 6, от около 3,5 до около 6, от около 4 до около 6, от около 4 до около 5,5 или от около 4 до около 5. В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент может вводиться при целевой ППК от около 3 до около 6. В определенных вариантах, ДНК-поражающий агент может вводиться при целевой ППК от около 4 до около 5. В данном описании термин "целевая ППК" относится к целевой 25 площади под кривой концентрации в плазме ко времени. Доза определенных ДНК-поражающих агентов может быть определена из инструкции к лекарственному средству. Например, доза в мг ДНК-поражающего агента может быть определена из целевой ППК на основе математической формулы, которая основана на существующей почечной функции пациента и желаемого низшего уровня тромбоцитов. Формулу Кальверта, 30 показанную ниже, применяют для расчета дозы в миллиграммах на основе скорости клубочковой фильтрации пациента (СКФ в мл/мин) и целевой площади карбоплатина под кривой концентрации ко времени (ППК в мг/мл•мин). СКФ может быть измерена с помощью ⁵¹Cr-ЭДТК клиренса или может быть оценена способами, известными специалисту в данной области техники.

35 Общая доза (мг)=(целевая ППК) × (СКФ+25)

Должно быть понятно, могут быть возможны все сочетания указанных выше 40 интервалов для доз ингибитора ДНК-ПК и доз ДНК-поражающего агента для применения в комбинированной терапии, как описано здесь. Например, в некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент вводят в дозе от около 20 до около 50 мг/м² (например, около 30, 40 или 50 мг/м²) и ингибитор ДНК-ПК вводят в дозе от около 120 мг до около 4000 мг/м (например, от около 60 мг до около 300 мг, от около 120 мг до около 600 мг, от около 240 до около 800 мг). В некоторых вариантах, ДНК-поражающий агент может вводиться при целевой ППК от около 3 до около 6 (например, от около 4 45 до около 6, от около 4 до около 5) и ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе от около 50 мг до около 300 мг (например, от около 60 мг до около 180 мг, от около 80 мг до около 100 мг).

В других вариантах, Ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе от около 50 мг/м²

до около 500 мг/м², от около 100 мг/м² до около 500 мг/м², от около 120 мг/м² до около 500 мг/м², от около 240 мг/м² до около 480 мг/м², от около 50 мг/м² до около 480 мг/м², от около 50 мг/м² до около 300 мг/м², от около 50 мг/м² до около 240 мг/м² или от

5 около 50 мг/м² до около 120 мг/м². В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе около 20 мг/м², 30 мг/м², 40 мг/м², 50 мг/м², 60 мг/м², около 120 мг/м², около 240 мг/м² или 480 мг/м². В некоторых вариантах, ингибитор ДНК-ПК может вводиться в дозе около 240 мг/м² или около 480 мг/м².

10 Фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты, пролекарства и другие производные

Описанные здесь соединения могут существовать в свободной форме или, где возможно, в виде солей. Эти соли, которые являются фармацевтически приемлемыми, представляют особый интерес, так как они применимы при введении соединений, 15 описанных ниже, для медицинских целей. Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, применяют в производственных процессах, для выделения и очистки, и в некоторых случаях, для применения при разделении стереоизомерных форм соединений или их промежуточных соединений.

20 В данном описании термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям соединения которые, с медицинской точки зрения, подходят для применения в контакте с тканями человека и низших животных без вызывания побочных эффектов, таких как токсичность, раздражение, аллергическая реакция и подобные, и соразмерно разумному соотношению польза/риска.

25 Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, у S.M. Berge et al., подробно описаны фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, включенном сюда в качестве ссылки.

Фармацевтически приемлемые соли описанных здесь соединений включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Эти 30 соли могут быть получены *in situ* во время конечного выделения и очистки соединений.

35 Если описанное здесь соединение содержит основную группу или достаточно основное биоизостерное соединение, кислотно-аддитивные соли могут быть получены 1) взаимодействием очищенного соединения в форме свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и 2) выделением полученной соли. На практике, кислотно-аддитивные соли могут быть более удобной формой для применения, и применения количеств соли для применения в свободной основной форме.

40 Примеры фармацевтически приемлемых не токсичных кислотно-аддитивных солей включают соли аминогруппы, полученные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота или с применением других способов, применяемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие 45 фармацевтически приемлемые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гликолят, глюконат, гликолят, гемисульфат, гептансоат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидрокситетансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат,

2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, салицилат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и подобные.

5 Если описанное здесь соединение содержит карбоксигруппу или достаточно кислоте биоизомерное соединение, основно-аддитивные соли могут быть получены 1) взаимодействием очищенного соединения в кислой форме с подходящим органическим или неорганическим основанием и 2) выделением полученной соли. На практике, применение основно-аддитивной соли может быть более удобным, и применение соли 10 образует по сути количества для применения в форме свободной кислоты. Соли, полученные из подходящих оснований, включают щелочной металл (например, натрий, литий и калий), щелочноземельный металл (например, магний и кальций), аммоний и $N^+(C_{1-4}\text{алкильные})_4$ соли. Кватернизация любых основных азотсодержащих групп 15 описанных соединений также рассматривается. Водо- или маслорастворимые или диспергируемые продукты могут быть получены такой кватернизацией.

Основно-аддитивные соли включают фармацевтически приемлемые соли металла и амина. Подходящие соли металла включают натрий, калий, кальций, барий, цинк, магний и алюминий. Натриевые и калиевые соли обычно предпочтительны. Другие 20 фармацевтически приемлемые соли включают, если возможно, не токсичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, полученные с применением противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат. Подходящие неорганические основно-аддитивные соли получают из металлических оснований, которые включают гидрид натрия, 25 гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния, гидроксид цинка и подобные. Подходящие аминовые основания получают из аминов, которые часто применяют в медицинской химии благодаря низкой токсичности и применимости в медицине. Аммиак, этилендиамин, 30 N-метилглюкин, лизин, аргинин, орнитин, холин, N,N'-дibenзилэтилендиамин, хлорпрокайн, диэтаноламин, прокайн, N-бензилфенилэтиламин, диэтиламин, пиперазин, три(гидроксиметил)аминометан, гидроксид тетраметиламмония, триэтиламин, 35 дibenзиламин, эфенамин, дегидроабиетиламин, N-этилпиперидин, бензиламин, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, этиламин, основные аминокислоты, дициклогексиламин и подобные являются примерами подходящих основно-аддитивных солей.

35 Другие кислоты и основания, хотя сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут применяться в получении солей, применяемых в качестве промежуточных соединений при получении описанных здесь соединений и их фармацевтически приемлемой соли или основно-аддитивных солей.

40 Смеси/сочетания различных фармацевтически приемлемых солей, а также смеси/сочетания соединений в свободной форме и фармацевтически приемлемых солей также рассматриваются здесь.

Описанные здесь соединения также могут существовать в виде фармацевтически приемлемых сольватов (например, гидратов) и клатратов. В данном описании 45 "фармацевтически приемлемым сольватом" является сольват, образованный при ассоциации молекулы одного или более фармацевтически приемлемого растворителя и одним или более соединениями, описанными здесь. Термин сольват включает гидраты (например, полугидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат, тетрагидрат и подобные).

В данном описании, термин "гидрат" означает описанное здесь соединение или его

соль, которые также включают стехиометрическое или не стехиометрическое количество воды, связанное не ковалентными межмолекулярными силами.

В данном описании термин "клатрат" означает описанное здесь соединение или его соль в форме кристаллической матрицы, которая содержит пространства (например, каналы), которые имеют гостевую молекулу (например, растворителя или воды) захваченную ей.

В дополнение к описанным здесь соединениям, фармацевтически приемлемые производные или пролекарства этих соединений также могут применяться в композициях для лечения или профилактики указанных расстройств.

"Фармацевтически приемлемое производное или пролекарство" включает любой фармацевтически приемлемый сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное или соль описанного здесь соединения, которое, при введении реципиенту, способно давать, прямо или косвенно, описанное здесь соединение или ингибирующее активный метаболит или остаток. Особенно полезными производными или

пролекарствами являются такие, которые повышают биодоступность соединений, когда такие соединения вводят пациенту (например, позволяют перорально вводимому соединению более легко абсорбироваться в кровь) или которые улучшают доставку исходного соединения к биологический отдел (например, мозг или лимфатическую систему) относительно исходного соединения.

В данном описании и если не указано иначе, термин "пролекарство" означает производное соединения, которое может гидролизоваться, окисляться или по другому реагировать в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) с получением описанного здесь соединения. Пролекарства могут становиться активными при таких реакциях в биологических условиях, или они могут обладать действием в непрореагировавших формах. Примеры пролекарств включают, но не ограничены ими, аналоги или производные соединений, которые содержат биогидролизуемые группы, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Другие примеры пролекарств включают производные описанных здесь соединений, которые содержат $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{ONO}$ или $-\text{ONO}_2$ группы. Пролекарства обычно могут быть получены с применением хорошо известных способов, таких как описаны в *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed.).

Сокристаллы

Любые из описанных здесь соединений, например, свободная форма, фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты, пролекарства и другие производные, могут существовать в виде сокристаллов с образователем сокристалла (ОСК). В сокристаллах и соединение и ОСК находятся в твердом состоянии (например, кристаллическом) и связаны не ковалентно (например, водородным связыванием). Типовые образователи сокристаллов (ОСК) включают, но не ограничены ими, адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. Понятно, что соединения, если не указано иное, охватывают сокристаллическую форму. Например, ссылка на соединение B-2 может охватывать сокристаллическую форму, если не указано иначе.

Способ получения и характеристизации сокристаллов хорошо задокументированы в литературе. См., например, Trask et al., *Chem. Commun.*, 2004, 890-891; и O. Almarsson and M. J. Zaworotko, *Chem. Commun.*, 2004, 1889-1896. Эти способы в общем также подходят для получения и характеристизации сокристаллов описанных здесь соединений.

Примеры получения сокристаллов включают экструзию горячего расплава, шаровой помол, плавление в реакционном блоке, выпаривание растворителя, превращение суспензии, смещивание, сублимацию или моделирование. В способе шарового помола определенные молярные доли компонентов сокристалла (например, целевое соединение 5 и ОСК) смешивают и измельчают шариками. Необязательно, растворитель, такой как метилэтилкетон, хлороформ и/или вода, могут быть добавлены в смеси, которую измельчают шариками. После измельчения смесь может быть высушена в вакууме либо при комнатной температуре, либо в условиях нагревания, что обычно дает порошковый продукт. В способе плавления компоненты сокристалла (например, ОСК и целевое 10 соединение) смешивают, необязательно с растворителем, таким как ацетонитрил. Смесь затем помещают в реакционный блок с закрытой крышкой и затем нагревают до эндотермы. Полученную смесь затем охлаждают и растворитель, если использовался, удаляют. В способе выпаривания из растворителя каждый компонент сокристалла 15 сначала растворяют в растворителе (например, смеси растворителей, такой как метанол/дихлорметановый азеотроп или толуол/ацетонитрил (например, 50/50 по объему)), и растворители затем смешивают вместе. Смесь затем осаждают, и растворитель выпаривают досуха с получением сокристалла. В способе экструзии горячего расплава (ЭГР) новый продукт (экструдат) получают проталкиванием его через отверстие или головку (экструдер) в контролируемых условиях, таких как температура, смещиванием, 20 скорость потока и давление. Экструдер обычно содержит платформу, которая поддерживает двигательную систему, шnekовую камеру, вращающийся червяк, расположенный на ходовом винте, и экструзионную головку для определения формы продукта. Альтернативно, экструзионная головка может быть удалена и продукт может быть сформован другими средствами. Обычно параметры процесса контролируются 25 через связь с центральной блоком электронного контроля. Приводная система экструзии обычно включает мотор, редуктор, передачи и подпятники, а цилиндр и червяк обычно применяются в модульной конфигурации. Могут применяться любые методики ЭГР, известные в данной области техники, например, Gavin P. Andrews et al., "Hot-melt extrusion: an emerging drug delivery technology", Pharmaceutical Technology Europe, volume 21, Issue 1 30 (2009). В одном варианте, сокристаллы получают экструзией горячего расплава.

Примеры способов характеризации включают термогравиметрический анализ (ТГА), дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), порошковую рентгеновскую дифракцию (ПРД), спектроскопию ядерного магнитного резонанса твердого тела (тт-ЯМР), анализы растворимости, динамическую сорбцию паров, инфракрасный анализ 35 отходящих газов и стабильность суспензии. ТГА может применяться для исследования присутствия остаточных растворителей в образце сокристалла и для идентификации температуры, при которой происходит расщепление каждого образца сокристалла. ДСК может применяться для наблюдения термопереходов, возникающих в образце сокристалла как функция от температуры и определения температуры плавления 40 каждого образца сокристалла. ПРД может применяться для структурной характеризации сокристалла. Анализ растворимости может проводиться для отражения изменений в физическом состоянии каждого образца сокристалла. Анализ стабильности суспензии может применяться для определения химической стабильности образца сокристалла в растворителе.

45 В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК имеет форму сокристалла.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является соединение формулы (В-І) (например, Соединение В-1, Соединение В-2 или Соединение В-3, Соединение С-1, Соединение С-2, Соединение С-3 или Соединение С-4, которое имеет форму

сокристалла. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является Соединение В-2, которое имеет форму сокристалла. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является СС-115, который имеет форму сокристалла.

В определенных вариантах, ингибитор ДНК-ПК имеет форму сокристалла с ОСК 5 адииновой кислотой, лимонной кислотой, фумаровой кислотой, малеиновой кислотой, янтарной кислотой или бензойной кислотой, где сокристаллом является твердым при комнатной температуре и соединение и ОСК взаимодействуют нековалентными связями. В определенных вариантах, нековалентные связи между соединением и ОСК включают 10 водородное связывание и взаимодействия Ван дер Ваальса. В одном варианте, ОСК является адииновой кислотой.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл, содержащий Соединение В-1 или его фармацевтически приемлемую соль, и образователь сокристалла (ОСК), выбранный из адииновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты. В определенных 15 вариантах, ОСК является адииновой кислотой. В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является сокристалл, содержащий Соединение В-2 или его фармацевтически приемлемую соль, и образователь сокристалла (ОСК), выбранный из адииновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты. В определенных вариантах, ОСК является 20 адииновой кислотой. Получение и характеристика сокристаллов Соединений В-1 и В-2 описаны в публикации РСТ № WO 2015/058067, включенной сюда в качестве ссылки полностью.

В определенных вариантах, ингибитором ДНК-ПК является Соединение В-2, и соединение имеет форму сокристалла формулы (Соединение В-2)_n:(AA)_m, где n равно 25 1 и m равно 0,4-2,1. В одном варианте, n равно 1 и m равно 0,9-3,1. В определенном варианте, n равно около 2 и m равно около 1. В определенных вариантах, сокристаллом является Соединение В-2 и ОСК адииновой кислотой, где молярное отношение Соединения В-2 к адииновой кислоте составляет около 2:1.

В определенных вариантах, сокристалл Соединения В-2 и ОСК адииновой кислоты 30 имеет полиморфную форму А или В. Полиморфные формы А и В включают два конформационных полиморфа сокристалла адииновой кислоты и соединения В-2.

В конкретном варианте, полиморфная форма А характеризуется пиками ¹³C спектроскопии ядерного магнитного резонанса твердого тела при около 117,1, 96,8, 35 95,7, 27,6, 14,8 ч./млн. В другом конкретном варианте, полиморфная форма А характеризуется пиками ¹³C спектроскопии ядерного магнитного резонанса твердого тела при около 161,6, 154,5, 117,1, 96,8, 95,7, 51,5, 50,2, 27,6, 25,6, 18,5 и 14,8 ч./млн. В еще одном конкретном варианте, полиморфная форма А характеризуется пиками ¹³C спектроскопии ядерного магнитного резонанса твердого тела при около 179,4, 168,4, 40 161,6, 158,3, 154,5, 147,8, 145,7, 143,2, 141,8, 124,6, 117,1, 96,8, 95,7, 51,5, 50,2, 31,2, 30,1, 27,6, 25,6, 18,5 и 14,8 ч./млн.

В конкретном варианте, полиморфная форма В характеризуется пиками ¹³C спектроскопии ядерного магнитного резонанса твердого тела при около 117,9, 97,3, 45 94,0, 26,7 и 15,7 ч./млн. В другом конкретном варианте, полиморфная форма В характеризуется пиками ¹³C спектроскопии ядерного магнитного резонанса твердого тела при около 161,7, 153,8, 117,9, 97,3, 94,0, 50,7, 25,3, 26,7, 18,8 и 15,7 ч./млн. В еще одном конкретном варианте, полиморфная форма В характеризуется пиками ¹³C

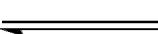
спектроскопии ядерного магнитного резонанса твердого тела при около 179,1, 168,3, 158,1, 147,2, 142,4, 125,8, 124,5, 117,9, 97,3, 94,0, 32,3, 30,1, 26,7 и 15,7 ч./млн.

В еще одном варианте, сокристалл соединения B-2 и ОСК адипиновая кислота является смесью полиморфных форм А и В.

Сокристаллы соединения и ОСК могут быть в выделенной, чистой форме или в смеси в виде твердой композиции при смешивании с другими материалами, например, свободной формой соединения или свободного ОСК. В одном варианте представлены фармацевтически приемлемые композиции, содержащие сокристаллы соединения и ОСК, описанные выше, и дополнительный свободный ОСК. В конкретном варианте, композиции содержат сокристаллы Соединения B-2 и ОСК адипиновой кислоты, описанные выше, и дополнительную адипиновую кислоту. В некоторых конкретных вариантах, общее молярное отношение соединения к ОСК (обе части сокристаллов и свободная ОСК, например, адипиновая кислота в сокристаллах и свободная адипиновая кислота) в таких композициях составляет от около 1:0,55 до около 1:100. В других специфических вариантах, общее молярное отношение соединения к ОСК в таких композициях составляет от около 1:0,55 до около 1:50. В других конкретных вариантах, общее молярное отношение соединения к ОСК в таких композициях составляет от около 1:0,55 до около 1:10. В некоторых конкретных вариантах, общее молярное отношение соединения к ОСК в таких композициях составляет от около 85% масс.:15% масс. до около 60% масс.:40% масс. В других конкретных вариантах, общее молярное отношение соединения к ОСК в таких композициях составляет от около 70% масс.:30% масс. до около 60% масс.:40% масс. В других конкретных вариантах, общее молярное отношение соединения к ОСК в таких композициях составляет около 65% масс.:35% масс.

В другом варианте представлены эвтектические твердые композиции, содержащие: (а) сокристалл, содержащий соединение и ОСК, который является адипиновой кислотой, и где молярное отношение соединения к адипиновой кислоте составляет от около 2 к 1; и (б) адипиновую кислоту. В данном описании термин "эвтектическое твердое вещество" означает твердый материал, получаемый эвтектической реакцией, известной в данной области техники. Не будучи связанными конкретной теорией, эвтектическая реакция определена следующим образом:

эвтектическая температура

Жидкость  **Твердая фаза А + Твердая фаза В**

В эвтектической реакции одна жидккая фаза и две твердые фазы все существуют в одно время и находятся в химическом равновесии. Она образует супер-решетку или микроструктуру при охлаждении, которая выделяет одновременно все свои компоненты в жидкую фазу (плавится) при определенной температуре (эвтектической температуре).

В одном варианте, общее массовое отношение соединения к адипиновой кислоте в эвтектической твердой композиции составляет от около 70% масс.:30% масс. до около 60% масс.:40% масс. В еще одном варианте, общее массовое отношение соединения к адипиновой кислоте составляет около 65% масс.:35% масс. В еще одном варианте, молярное отношение сокристалла соединения к адипиновой кислоте составляет около 1 к 1,03.

Чистая форма означает, что конкретный сокристалл или полиморфная форма содержит более 95% (масс./масс.), например, более 98% (масс./масс.), более 99% (масс./масс.), более 99,5% (масс./масс.) или более 99,9% (масс./масс.).

Более конкретно, представлены фармацевтически приемлемые композиции, где каждый из сокристаллов или полиморфных форм имеет форму композиции или смеси

полиморфной формы с одной или более кристаллической, сольватированной, аморфной или других полиморфных форм или их сочетаний. Например, в одном варианте, композиции содержат форму А сокристалла адипиновой кислоты с соединением В-2 вместе с одной или более другими полиморфными формами соединения В-2, такими

5 как аморфная форма, гидраты, сольваты и/или другие формы или их сочетания. В конкретном варианте, композиции содержат форму А сокристалла адипиновой кислоты с соединением В-2 вместе с формой В сокристалла адипиновой кислоты с соединением В-2. Более конкретно, композиция может содержать от следов до вплоть до 100% конкретной полиморфной формы или любое количество, например, в интервале 0,1%-10,5%, 0,1%-1%, 0,1%-2%, 0,1%-5%, 0,1%-10%, 0,1%-20%, 0,1%-30%, 0,1%-40%, 0,1%-50%, 10 1%-50% или 10%-50% массовых по отношению к общему количеству соединения в композиции. Альтернативно, композиция может содержать, по крайней мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% массовых конкретной полиморфной формы по отношению к общему количеству соединения в композиции.

15 В определенных вариантах, сокристалл вводят в интервале от около 50 мг до около 200 мг в сутки, включительно; в интервале от около 50 мг до около 2000 мг в сутки, включительно; или в интервале от около 100 мг до около 1500 мг в сутки, включительно.

Терапевтическое применение

В данном описании представлен способ лечения заболеваний, расстройств и состояний, характеризуемых избыточной или аномальной пролиферацией клеток, включая пролиферативные или гиперпролиферативные заболевания, у субъекта. "Пролиферативное заболевание" относится к заболеванию, которое возникает из-за аномального роста или расширения размножением клеток. См., например, Walker, Cambridge Dictionary of Biology; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1990.

25 Пролиферативное заболевание может быть связано с: 1) патологической пролиферацией обычно неактивных клеток; 2) патологической миграцией клеток из их обычного места (например, метастазы клеток новообразований); 3) патологической экспрессией протеолитических ферментов, таких как матричные металлопротеиназы (например, коллагеназы, желатиназы и эластазы); или 4) патологическим ангиогенезом как при 30 пролиферативной ретинопатии и опухолевых метастазах. Типовые пролиферативные заболевания включают, но не ограничены ими, раки (т.е., "злокачественные новообразования"), доброкачественные новообразования, ангиогенез, воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания.

35 Термин "ангиогенез" относится к физиологическому процессу, посредством которого новые кровеносные сосуды образуются из ранее существующих сосудов. Ангиогенез отличается от васкулогенеза, который представляет собой *de novo* образование эндотелиальных клеток из предшественников клеток мезодермы. Первые сосуды в развивающемся эмбрионе образуются васкулогенезом, после чего ангиогенез отвечает за рост большинства кровеносных сосудов во время нормального или аномального 40 развития. Ангиогенез является жизненно важным процессом при росте и развитии, а также при заживлении ран и при образовании грануляционной ткани. Однако ангиогенез также является фундаментальным шагом при переходе опухолей из доброкачественного состояния в злокачественное, приводящем к применению ингибиторов ангиогенеза при лечении рака. Ангиогенез может быть химически стимулирован ангиогенными белками, 45 такими как факторы роста (например, ФРЭС). "Патологический ангиогенез" относится к аномальному (например, избыточному или недостаточному) ангиогенезу, который составляет и/или ассоциирован и заболеванием.

Термины "новообразование" и "опухоль" применяют взаимозаменяя, и они

относятся к аномальной массе ткани, где рост массы перегоняет и не координируется с ростом нормальной ткани. Новообразование или опухоль могут быть "доброподобным" или "злокачественным" в зависимости от следующих

характеристик: степень клеточной дифференциации (включая морфологию и

- 5 функциональность), скорость роста, местная инвазия и метастазы. "Доброподобное новообразование" обычно хорошо дифференцировано, имеет характерно более медленный рост, чем злокачественное новообразование, и остается локализованным в месте возникновения. Кроме того, доброкачественное новообразование не обладает способностью инфильтрировать, инвазировать или метастазировать в другие места.
- 10 Типовые доброкачественные новообразования включают, но не ограничены ими, липому, хондрому, аденомы, акрохордон, старческие ангиомы, себорейный кератоз, веснушки и гиперплазию сальных желез. В некоторых случаях, определенные "доброподобные" опухоли могут позднее давать начало злокачественным новообразованиям, которые могут возникнуть при дополнительных генетических
- 15 изменениях в субпопуляции клеток опухолевого новообразования, и эти опухоли называют "пред-злокачественные новообразования". Типовым пред-злокачественным образованием является тератома. Наоборот, "злокачественно новообразование" обычно плохо дифференцируется (анаплазия) и имеет характерно более быстрый рост, сопровождаемый прогрессирующей инфильтрацией, инвазией и разрушением
- 20 окружающей ткани. Более того, злокачественное новообразование обычно обладает способностью метастазировать в другие места. Термин "метастазы", "метастазный" или "метастазировать" относится к расширению или миграции раковых клеток из первичной или оригинальной опухоли в другой орган или ткань, и обычно идентифицируется присутствием "вторичной опухоли" или "вторичной клеточной массы" тканевого типа
- 25 первичной или оригинальной опухоли, а не этого органа или ткани, в которой расположена вторичная (метастазная) опухоль. Например, рак простаты, который мигрировал в кость, называют метастазированным раком простаты, и он включает раковые клетки рака простаты, растущие в костной ткани.

Термин "рак" относится к классу заболеваний, характеризуемому развитием

- 30 аномальных клеток, которые пролиферируют неконтролируемо и обладают способностью проникать и разрушать нормальные ткани тела. См., например, Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990. Типовые раки включают, но не ограничены ими, гемобластозы. Термин "гемобластоз" относится к опухолям, которые поражают кровь, костный мозг и/или лимфатические узлы. Типовые гемобластозы включают, но не ограничены ими, лейкоз, такой как острый лимфатический лейкоз (ОЛЛ) (например, ОЛЛ В-клеток, ОЛЛ Т-клеток), острый миелоцитный лейкоз (ОМЛ) (например, ОМЛ В-клеток, ОМЛ Т-клеток), хронический миелоцитный лейкоз (ХМЛ) (например, ХМЛ В-клеток, ХМЛ Т-клеток) и хронический лимфоцитный лейкоз (ХЛЛ) (например, ХЛЛ В-клеток, ХЛЛ Т-клеток); лимфому, такую как лимфому Ходжкина (ЛХ) (например, ЛХ В-клеток, ЛХ Т-клеток) и неходжкинскую лимфому (НХЛ) (например, НХЛ В-клеток, такую как диффузная крупноклеточная лимфома (ДККЛ) (например, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ, например, активированная В-клеточная (АВК) ДВККЛ (АВК-ДВККЛ)), фолликулярную лимфому, хронический лимфоцитный лейкоз/мелкоклеточную
- 40 лимфоцитную лимфому (ХЛЛ/МЛЛ), лимфому мантийных клеток (ЛМК), В-клеточную лимфому маргинальной зоны (например, лимфому ассоциированной со слизистой лимфоидной ткани (АСЛТ), В-клеточную лимфому узловой маргинальной зоны, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки), первичную медиастенальную В-
- 45 лимфоцитную лимфому (ХЛЛ/МЛЛ), лимфому мантийных клеток (ЛМК), В-клеточную лимфому маргинальной зоны (например, лимфому ассоциированной со слизистой лимфоидной ткани (АСЛТ), В-клеточную лимфому узловой маргинальной зоны, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки), первичную медиастенальную В-

клеточную лимфому, лимфому Буркитта, макрогообулиниемию Вальденстрема (МВ, лимфоплазмочитарную лимфому), лейкоз волосистых клеток (ЛВК), иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому предшественника, лимфому центральной нервной системы (ЦНС) (например, первичную лимфому ЦНС и вторичную лимфому ЦНС); и Т-клеточную НХЛ, такую как Т-лимфобластную лимфому/лейкоз предшественника, периферическую Т-клеточную лимфому (ПТКЛ) (например, кожную Т-клеточную лимфому (КТКЛ) (например, фунгоидный микоз, синдром Сезари), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, внеузловую Т-клеточную лимфому из натуральных киллеров, Т-клеточную лимфому энтеропатического типа, Т-клеточную лимфому типа подкожного панникулита и анапластическую крепноклеточную лимфому); лимфому иммунной привилегированной области (например, церебральную лимфому, глазную лимфому, лимфому плаценты, лимфому плода, лимфому яичек); смесь одной или более лейкоза/лимфомы, описанных выше; миелодиспазию; и множественную миелому (ММ). Дополнительные типовые раки включают, но не ограничены ими, рак легкого (например, бронхогенную карциному, мелкоклеточный рак легких (МКРЛ), не мелкоклеточный рак легких (НМКРЛ), аденокарциному легкого); рак почек (например, нефробластому, она же опухоль Вильмса, карциному почечных клеток); акустическую неврому; аденокарциному; рак надпочечников; рак ануса; ангиосаркому (например, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, гемангиосаркому); рак аппендикса; доброизластенную моноклональную гаммопатию; желчный рак (например, холангиокарциному); рак мочевого пузыря; рак молочной железы (например, аденокарциному молочной железы, папиллярную карциному молочной железы, рак молочной железы, медуллярную карциному молочной железы); рак мозга (например, менингиому, глиобластомы, глиому (например, астроцитому, олигодендроглиому), медуллобластому); рак бронхов; карциноид; рак шейки матки (например, аденокарциному шейки матки); хориокарциному; хордому; крациофарингиому; рак прямой и ободочной кишки (например, рак толстой кишки, рак прямой кишки, аденокарциному прямой и ободочной кишки); рак соединительной ткани; эпителиальную карциному; эпендимому; эндотелиосаркому (например, саркому Капоши, множественную идиопатическую геморрагическую саркому); рак эндометрия (например, рак матки, саркому матки); рак пищевода (например, аденокарциному пищевода, аденокарциному Барретта); саркому Юинга; рак глаза (например, внутриглазную меланому, ретинобластому); наследственную гиперэозинофилию; рак желчного пузыря; рак желудка (например, аденокарциному желудка); желудочно-кишечную стромальную опухоль (ЖКСО); герминогенный рак; рак головы и шеи (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак ротовой полости (например, плоскоклеточную карциному ротовой полости), рак горла (например, рак гортани, фарингеальный рак, рак носоглотки, рак ротоглотки)); болезнь тяжелых цепей (например, болезнь альфа цепей, болезнь гамма цепей, болезнь мю цепей; гемангиобластому; рак гортаноглотки; воспалительные миофибробластные опухоли; имуноцитный амилоидоз; рак печени (например, печеночно-клеточный рак (ПКР), злокачественную гепатому); лейомиосаркому (ЛМС); мастоцитоз (например, системный мастоцитоз); рак мышц; миелодиспластический синдром (МДС); мезотелиому; миелопролиферативное заболевание (МПЗ) (например, истинную полицитемию (ИП), эссенциальный тромбоцитоз (ЭТ), ангиогенную миелоидную метаплазию (АММ), она же миелофиброз (МФ), хронический идиопатический миелофиброз, хронический миелоцитный лейкоз (ХМЛ), хронический нейтрофильный лейкоз (ХНЛ), гиперэозинофильный синдром (ГЭС)); нейробластому; нейрофиброму (например, нейрофиброматоз (НФ) 1 типа или

2 типа, шванноматоз); нейроэндокринный рак (например, гастроэнтеропанкреатическую нейроэндокринную опухоль (ГЭП-НЭО), карциноидную опухоль); остеосаркому (например, рак костей); рак яичников (например, цистаденокарциному, эмбриональную карциному яичников аденокарциному яичников); папиллярную аденокарциному; рак 5 поджелудочной железы (например, панкреатическую аденокарциному, внутривеную папиллярно-муцинозную опухоль (ВПМО), опухоли островковых клеток); рак пениса (например, болезнь Пэджета пениса и мошонки); пинеалому; примитивную нейроэктодермальную опухоль (ПНО); неоплазию клеток плазмы; паранеопластические синдромы; интраэпителиальные новообразования; рак простаты 10 (например, аденокарциному простаты); рак прямой кишки; рабдомиосаркому; рак слюнной железы; рак кожи (например, плоскоклеточную карциному (ПКК), кератоакантому (КА), меланому, базальноклеточную карциному (БКК)); рак тонкого кишечника (например, рак аппендикса); саркому мягких тканей (например, злокачественную фиброзную гистиоцитому (ЗФГ), липосаркому, злокачественную 15 опухоль оболочек периферических нервов (ЗОПН), хондросаркому, фиброзаркому, миксосаркому); карциному сальной железы; рак тонкого кишечника; карциному потовых желез; синовиому; рак яичек (например, семиному, эмбриональную карциному яичек); рак щитовидной железы (например, папиллярную карциному щитовидной железы, папиллярную тироидную карциному (ПТК), медуллярный рак щитовидной железы); 20 рак уретры; рак влагалища; и рак вульвы (например, болезнь Пэджета вульвы).

В некоторых вариантах, термин "рак" включает, но не ограничен ими, следующие типы рака: ротовой полости, легкого, желудочно-кишечный, мочеполового тракта, печени, костей, нервной системы, гинекологический, кожи, щитовидной железы или надпочечников. Более конкретно, "рак" включает, но не ограничен ими, следующие 25 раки: рак ротовой полости: рак букальной полости, рак губ, рак языка, рак рта, рак гортани; рак сердца: саркому (ангиосаркому, фиброзаркому, рабдомиосаркому, липосаркому), миксому, рабдомиому, фиброму, липому или тератому; рак легкого: бронхогенную карциному (плоскоклеточную или эпидермоид, недифференцированную мелкоклеточную, недифференцированную крупноклеточную, аденокарциному), 30 альвеолярную (бронхиоларную) карциному, бронхиальную аденому, саркому, лимфому, хондроматозную гамартому или мезотелиому; желудочно-кишечный рак: рак пищевода (плоскоклеточную карциному, гортани, аденокарциному, лейомиосаркому, лимфому), рак желудка (карциному, лимфому, лейомиосаркому), рак поджелудочной железы (протоковую аденокарциному, инсулину, глюкагону, гастрину, карциноидные 35 опухоли, вилому), рак тонкой кишки или тонкого кишечника (аденокарциному, лимфому, карциноидные опухоли, саркому Капоши, лейомиому, гемангиому, липому, нейрофиброму, фиброму), рак толстой кишки или толстого кишечника (аденокарциному, тубулярную карциному, ворсинчатую аденому, гамартому, лейомиому), рак толстой кишки, рак толстой кишки-прямой кишки, рак прямой и ободочной кишки или рак 40 толстой кишки; рак мочеполовых путей: рак почек (аденокарциному, опухоль Вильма [нефробластому], лимфому), рак мочевого пузыря и рак уретры (плоскоклеточную карциному, переходноклеточную карциному, аденокарциному), простаты (аденокарциному, саркому), рак яичек (семиному, тератому, эмбриональную карциному, тератокарциному, хориокарциному, саркому, интерстициальную карциному, фиброму, 45 фиброаденому, аденоматоидные опухоли, липому); рак печени: гепатому (печеночноклеточную карциному), холангикарциному, гепатобластому, ангиосаркому, печеночноклеточную аденому, гемангиому или рак желчных протоков; рак костей: остеогенную саркому (остеосаркому), фиброзаркому, злокачественную фиброзную

гистиоцитому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную лимфому (ретикулосаркому), множественную миелому, злокачественную гигантоклеточную опухолевую хордому, остеохронфому (костно-хрящевой экзостоз), доброкачественную хондруму, хондробластому, хондромиксофиброму, остеоидную остеому или

- 5 гигантоклеточные опухоли; рак нервной системы: рак черепа (остеому, гемангиому, гранулему, ксантуму, деформирующий остиг), рак оболочки головного мозга (менингиому, менингиосаркому, глиоматоз), рак мозга (астроцитому, медуллобластому, глиому, эпендимому, герминому [пинеалому], мультиформную глиобластому, олигодендроглиому, шванному, ретинобластому, врожденные опухоли), нейрофиброму
- 10 спинного мозга или менингиому, глиому, саркому); гинекологические раки: рак матки (эндометриальную карциному), рак шейки матки (карциному шейки матки, предопухолевую дисплазию шейки матки), рак яичников (карциному яичников [серозную цистаденокарциному, муцинозную цистаденокарциному, неклассифицированную карциному], опухоли зернисто-оболочковых клеток, опухоли клеток Сертоли-Лейдига,
- 15 дисгерминому, злокачественную тератому), рак вульвы (плоскоклеточную карциному, интраэпителиальную карциному, аденокарциному, фибросаркому, меланому), рак вагины (светолоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, ботриоидную саркому (эмбриональную рабдомиосаркому), рак фаллопиевых труб (карциному) или рак молочной железы; рак кожи: злокачественную меланому, базалиому,
- 20 плоскоклеточную карциному, саркому Капоши, кератоакантому, диспластические невусы, липому, ангиому, дерматофибром или келоиды; рак щитовидной железы: папиллярную карциному щитовидной железы, фолликулярную карциному щитовидной железы; медуллярную карциному щитовидной железы, множественное эндокринное новообразование 2А типа, множественное эндокринное новообразование 2В типа,
- 25 наследственный медуллярный рак щитовидной железы, феохромоцитому или параганглиому; или рак надпочечников: нейробластому.

В других вариантах, раком является рак легкого (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких), рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак

- 30 желудка, рак мозга, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак прямой и ободочной кишки, глиобластома, рак пищевода, печеночно-клеточная карцинома или рак яичников.

Термин "воспалительное заболевание" относится к заболеванию, вызванному, возникающему вследствие или дающему воспаление. Термин "воспалительное

- 35 заболевание" также может относится к неуправляемой воспалительной реакции, которая вызывает расширенную реакцию макрофагов, гранулоцитов и/или Т-лимфоцитов, приводящую к аномальному повреждению ткани и/или смерти клеток. Воспалительное заболевание может быть либо острым, либо хроническим воспалительным состоянием, и может возникать по инфекционным или не инфекционным причинам. Воспалительные
- 40 заболевания включают, без ограничений, атеросклероз, артериосклероз, аутоиммунные расстройства, рассеянный склероз, системная красная волчанка, ревматическая полимиалгия (РПМ), подагрический артрит, дегенеративный артрит, тенонит, бурсит, псориаз, кистозный фиброз, эпифизит, ревматоидный артрит, воспалительный артрит, синдром Съоргена, гигантоклеточный артериит, прогрессирующий системный склероз
- 45 (склеродерма), анкилозирующий спондилит, полимиозит, дерматомиозит, пемфигус, пемфигоид, диабет (например, I типа), миастению гравис, тироидит Хашимото, болезнь Грейвса, болезнь Гудпасчера, смешанное заболевание соединительной ткани, склерозирующий холангит, воспалительная болезнь кишечника, болезнь Крона,

язвенный колит, пернициозную анемию, воспалительный дерматоз, обычный интерстициальный пневмонит (ОИП), асбестоз, силикоз, бронхоэкстаз, бериллиоз, талькоз, пневмокониоз, саркоидоз, десквамативную интерстициальную пневмонию, лимфоидную интерстициальную пневмонию, гигантоклеточную интерстициальную 5 пневмонию, клеточную интерстициальную пневмонию, пневмонит гиперчувствительности, гранулематоз Вегенера и родственные формы ангиита (временный артериит и нодозный полиартериит), воспалительный дерматоз, гепатит, реакции гиперчувствительности отложенного типа (например, дерматит ядовитого плюща), пневмонию, воспаление дыхательных путей, респираторный дистресс синдром 10 у взрослых (РДСВ), энцефалит, немедленные реакции гиперчувствительности, астму, сенную лихорадку, аллергии, острый анафилактический шок, ревматическую лихорадку, гломерулонефрит, пиелонефрит, целлюлит, цистит, хронический холецистит, ишемию (ишемическое повреждение), реперфузионное повреждение, аппендицит, артериит, блефарит, бронхиолит, бронхит, цервицит, холангит, хориоамнионит, конъюнктивит, 15 дакриоаденит, дерматомиозит, эндокардит, эндометрит, энтерит, энтероколит, эпикондилит, эпидидимит, фасциит, фиброзит, гастрит, гастроэнтерит, гингивит, илеит, ирит, ларингит, миелит, миокардит, нефрит, омфалит, оофорит, орхит, остеит, отит, панкреатит, паротит, перикардит, фарингит, плеврит, флебит, пневмонит, проктит, 20 простатит, ринит, салпингит, синусит, стоматит, синовит, тестит, тонзиллит, уретрит, уроцистит,uveit, вагинит, васскулит, вульвит, вульвовагинит, ангиит, хронический бронхит, остеомиелит, оптический неврит, височный артериит, поперечный миелит, некротизирующий фасциит и некротизирующий энтероколит. Глазное воспалительное заболевание включает, но не ограничено им, послеоперационное воспаление.

"Автоиммунное заболевание" относится к заболеванию, возникающему при

25 неподходящей иммунной реакции тела субъекта на вещества и ткани, обычно присутствующие в теле. Другими словами, иммунная система ошибочно распознает часть тела как патоген и атакует свои собственные клетки. Это может быть ограничено определенными органами (например, аутоиммунный тироидит) или включает конкретную ткань в разных местах (например, болезнь Гудпасчера, которая может 30 поражать базальную мембрану в легком и почке). Лечение аутоиммунных заболеваний обычно проводят иммунодепрессантами, например, лекарственными средствами, которые снижают иммунную реакцию. Типовые аутоиммунные заболевания включают, но не ограничены ими, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, некротизирующий васскулит, лимфаденит, нодозный периартериит, системную красную волчанку, 35 ревматоидный артрит, псориазный артрит, системную красную волчанку, псориаз, язвенный колит, системный склероз, дерматомиозит/полимиозит, синдром антифосфолипидного антитела, склеродерму, обыкновенную пузырчатку, АНЦА-ассоциированный васскулит (например, гранулематоз Вегенера, микроскопический полиангит),uveit, синдром Съоргена, болезнь Крона, синдром Рейтера, 40 анкилозирующий спондилит, болезнь Лайма, синдром Гийена-Барре, тироидит Хашимото и кардиомиопатию.

Как в общем описано выше, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в таковом, ДНК-поражающего агента и через от около 8 до около 48 часов введение субъекту ингибитора ДНК-ПК. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от 45 около 8 до около 30 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 8 до около 20 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 10 до около 20 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых

вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 12 до около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК вводят в течение от около 14 до около 18 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 14 до около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-ПК ингибитор вводят в течение около 16 часов после введения ДНК-поражающего агента. В некоторых вариантах, ДНК-поражающим агентом является химиотерапия.

"Субъект", которому осуществляют введение, включает, но не ограничен ими, человека; коммерчески ценных млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, козы, кошки и/или собаки) и птиц (например, коммерчески ценных птиц, таких как куры, утки, гуси и/или индейки). Субъектом, нуждающимся в лечении, является субъект, идентифицированный как имеющий пролиферативное расстройство, т.е. терапевт диагностировал у пациента (например, с применением способов, хорошо известных в данной области техники) пролиферативное расстройство (например, рак). В некоторых вариантах, субъектом, нуждающимся в лечении, является субъект, подозреваемый в наличии или развитии пролиферативного расстройства, такой как субъект, имеющий один или более симптомов, характерных для пролиферативного расстройства. Термин "субъект, нуждающийся в лечении" также включает людей, которые когда-то имели пролиферативное расстройство, но симптомы которых облегчены. Для рака, один или более симптомов или клинических признаков зависит от типа и расположения опухоли. Например, опухоли легких могут вызывать кашель, затруднение дыхания или боль в груди. Опухоли прямой кишки могут вызывать потерю веса, диарею, запор, железодефицитную анемию и кровь в стуле. Следующие симптомы возникают при большинстве опухолей: озноб, усталость, лихорадка, потеря аппетита, беспокойство, ночные потоотделение и потеря веса.

Термины "вводить", "введение" или "введение" в данном описании относятся к имплантации, абсорбции, поглощению или ингаляции одного или более терапевтических агентов.

В данном описании термины "лечение", "лечить" и "лечение" относятся к обращению, облегчению, задержке наступления или ингибированию развития пролиферативного расстройства. В некоторых вариантах, лечение может вводиться после одного или более развившихся или наблюдаемых признаков или симптомов. В других вариантах, лечение может вводиться в отсутствие признаков или симптомов пролиферативного расстройства. Например, лечение может вводиться предрасположенному индивидууму до наступления симптомов (например, с учетом истории симптомов и/или с учетом генетических или других факторов предрасположенности). Лечение также может продолжаться после устранения симптомов, например, для задержки или предотвращения рецидива.

В данном описании термин "масса опухоли" имеет оригинальное значение, применяемое в данной области техники, и может относиться к количеству раковых клеток, размеру опухоли или количеству рака в теле.

В данном описании термин "около" имеет оригинальное значение, применяемое в данной области техники. В некоторых вариантах относительно времени, около может составлять в пределах 50 минут, в пределах 40 минут, в пределах 30 минут, в пределах 20 минут, в пределах 10 минут, в пределах 5 минут или в пределах 1 минуты (до и/или после) определенного времени. В некоторых вариантах относительно дозы, около может означать в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10%, в пределах 5% или в пределах 1% (ниже и/или выше) определенной дозы.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для вызова желаемой биологической реакции, т.е. лечения пролиферативного расстройства. "Эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" применяют как синонимы. Как должно быть понятно специалисту в данной области

5 техники, эффективное количество описанного здесь соединения может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемый биологический ожидаемый результат, фармакокинетика соединения, лечимое состояние, способ введения и возраст и состояние здоровья пациента. Эффективное количество включает, но не ограничено им, количество, необходимое для замедления, снижения, ингибиования, облегчения или обращения

10 одного или более симптомов, связанных с новообразованием. Например, при лечении рака такие термины могут относиться к снижению размера опухоли.

Эффективное количество соединения может варьироваться от 0,001 мг/кг до около 1000 мг/кг одной или более введениями дозы, в течение одного или нескольких дней (в зависимости от способа введения). В определенных вариантах, эффективное количество

15 варьируется от около 0,001 мг/кг до около 1000 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 750 мг/кг, от около 0,1 мг/кг до около 500 мг/кг, от около 1,0 мг/кг до около 250 мг/кг и от около 10,0 мг/кг до около 150 мг/кг.

Представленное здесь соединение может вводиться любым путем, включая

энтеральный (например, пероральный), парентеральный, внутривенный,

20 внутримышечный, внутриартериальный, внутримозговой, интракальвенный, подкожный, интравентрикулярный, чрезкожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), слизистый, назальный, буккальный, подъязычный; интракраниальным вливанием, бронхиальным вливанием и/или ингаляцией; и/или пероральным спреем, назальным спреем и/или аэрозолем.

25 Особенno рассматриваемыми путями является пероральное введение, внутривенное введение (например, системное внутривенная инъекция), местное введение через кровь и/или лимфу, и/или прямое введение в пораженное место. В общем, наиболее подходящий путь введения зависит от множества факторов, включая природу агента (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояния субъекта

30 (например, способен ли субъект переносить пероральное введение).

Точное количество соединения, требуемое для достижения терапевтически эффективного количества, варьируется от субъекта к субъекту, в зависимости, например, от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести побочных эффектов или расстройства, идентичности конкретного соединения, способа введения и подобных.

35 Желаемая доза может доставляться три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, через день, каждые три дня, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В определенных вариантах, желаемая доза может доставляться с применением множества введений (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати

40 или более введений).

В определенных вариантах, терапевтически эффективное количество соединения для введения один или более раз в сутки 70 кг взрослому человеку может составлять от около 0,0001 мг до около 3000 мг, от около 0,0001 мг до около 2000 мг, от около 0,0001 мг до около 1000 мг, от около 0,001 мг до около 1000 мг, от около 0,01 мг до около 1000 мг, от около 0,1 мг до около 1000 мг, от около 1 мг до около 1000 мг, от около 1 мг до около 100 мг, от около 10 мг до около 1000 мг или от около 100 мг до около 1000 мг соединения на стандартную дозированную форму.

В определенных вариантах, представленные здесь соединения могут вводиться в

дозе, достаточной для доставки от около 0,001 мг/кг до около 100 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг, предпочтительно, от около 0,1 мг/кг до около 40 мг/кг, предпочтительно, от около 0,5 мг/кг до около 30 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг и более предпочтительно, от около 1 мг/кг до около 25 мг/кг массы тела пациента в сутки, один или более раз в сутки, для получения желаемого терапевтического эффекта.

Должно быть понятно, что интервалы доз, описанные здесь, являются руководством для введения заявленных фармацевтических композиций взрослому человеку. Количество для введения, например, ребенку или подростку, может быть определено медицинским практиком или специалистом в данной области техники и может быть ниже или таким же, как вводимое взрослому человеку.

Биологические образцы

В качестве ингибиторов ДНК-ПК пути, соединения и композиции также применяют в биологических образцах. Один аспект относится к вызыванию повреждения ДНК и ингибирированию ДНК-ПК в биологическом образце, где способ включает контакт указанного биологического образца с ДНК-поражающим агентом с последующим контактом образца через около 8-48 часов с соединением, которое ингибирует активность ДНК-ПК. Термин "биологический образец" в данном описании означает *in vitro* или *ex vivo* образец, включая, без ограничений, клеточные культуры или их экстракты; биопсированный материал, полученный у млекопитающего, или его экстракты; и кровь, слону, мочу, фекалии, семя или другие жидкости тела или их экстракты.

Вызов повреждения ДНК с последующим ингибирированием активности ДНК-ПК в биологическом образце применяют для множества целей, которые известны специалисту в данной области техники. Примеры таких целей включают, но не ограничены ими, переливание крови, трансплантацию органа и хранение биологического образца.

ПРИМЕРЫ

С учетом представленного выше описания, конкретные не ограничивающие примеры, представленные ниже, даны для иллюстративных целей и не ограничивают объем описания каким-либо образом.

В данном описании все аббревиатуры, символы и условные обозначения соответствуют тем, которые применяют в современной научной литературе. См., например, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2nd Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997. Следующие определения описывают термины и аббревиатуры, которые могут применяться здесь:

Аббревиатура	Термин
ХИАД	химическая ионизация при атмосферном давлении
АТСС	Американская коллекция типовых культур
АТМ	мутантная при атаксии-телеангидракции киназа
ATR	атаксия-телеангидракция и Rad3-родственная киназа
ППК	площадь под кривой концентрации во времени
др.	два раза в сутки
НПКО	ниже предела количественного определения
СКК	сухая капля крови
ΔС	изменение объема опухоли в контрольной группе
ΔТ	изменение объема опухоли в лечимой группе
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК-ПК	ДНК-зависимая протеинкиназа
ДНК-ПКкп	ДНК-зависимая протеинкиназа каталитическая подъединица
ДСР	разрыв двухспиральной ДНК

5	ГР	гомологическая рекомбинация
	ИО	ионизирующее облучение
	ВБ	внутрибрюшинно
	ВВ	внутривенно
	ЖХ/МС/МС	жидкостная хроматография-масс спектрометрия и жидкостная хроматография-тандемная масс спектрометрия
	НПКО	нижний предел количественного определения
	ММР	мониторинг множественных реакций
	mTOR	мишень рапамицина в клетках мlekопитающих
	НСК	негомологичное соединение концов
10	ПЛД	пэгилированный липосомальный доксорубицин (DOXIL®)
	Р1КК	фосфатидилинозит 3-киназа-родственная киназа
	ПО	пероральная доза
	орс	один раз в сутки
	СОС	стандартная ошибка среднего
15	Ti	объем опухоли в день лечения
	ДМСО	диметилсульфоксид
	DMEM	модифицированная способом Дульбекко среда Игла
	пен/стреп	пенициллин стрептомицин
	НМКРЛ	немелкоклеточный рак легких
	МКРЛ	мелкоклеточный рак легких
	НЕРЕС	4-(2-гидроксигидро-1-пиперазинстансульфоновая кислота
	L	самое длинное измерение опухоли
	W	самое короткое измерение опухоли
	МЦ	метилцеллюлоза
20	ANOVA	однофакторный дисперсионный анализ
	DOX	доксорубицин
	EC50	полумаксимальная эффективная концентрация
	АВС	альбумин бычьей сыворотки
	ФБС	фетальная бычья сыворотка
	НО	не оценивали
	РС-1	первичная культура-1
	ФРФБ	физиологический раствор с фосфатным буфером
	РТ	радиотерапия
25	АХО	анализ химиочувствительности опухоли
	ОСК	опухолевая стволовая клетка
	ПКК	печеночно-клеточная карцинома
	ЛТВК	лучевая терапия под визуальным контролем
	5-FU	5-фторурацил
	ПР	полная реакция
	МПД	максимальная переносимая доза
	СОО	средний объем опухоли
	ЧР	частичная реакция
	ОРН	один раз в неделю
30	об./мин.	обороты в минуту
	ПК	подкожно
	ПБО	пациенты, перенесшие рак, без опухоли
	ИРО	ингибирирование роста опухоли
	ОО	объем опухоли

Пример 1: Соединение В-2 СоX и пэгилированный липосомный Доксорубицин для

35 введения

Сокристалл соединения В-2 и адипиновой кислоты. Получение и характеристизация сокристаллов соединения В-2 и адипиновой кислоты описано в WO 2015/058067, включенной сюда в качестве ссылки. Способы получения и характеристизации также представлены ниже и здесь.

40 Получение соединение В-2 СоX. В 1 литровый сосуд в кожухе (с верхним перемешиванием) загружают соединение В-2 (1,000 эквив.), адипиновую кислоту (2,614 эквив.), 1-пропанол (122,564 эквив.) и суспензию перемешивают при 750 об./мин. Добавляют затравку сокристалла (0,5% затравку сокристалла), и реакционную смесь перемешивают при 25°C. Образование сокристалла отслеживают удалением аликов и анализом рамановской спектроскопией. Через 114 часов определяют, что образование сокристалла завершено. Суспензию фильтруют с применением 600 мл спекшейся воронки средней пористости до тех пор, пока уровень растворителя не станет равен влажной лепешке. Маточную жидкость отделяют, метят и анализируют содержание. Затем

влажную лепешку промывают 1-пропанолом. Твердую влажную лепешку взвешивают и сушат в вакуумной печи при 50°C. ВЭЖХ анализ показал стехиометрию 2:1 соединения B-2 к адипиновой кислоте ("соединение B-2 CoX"). Полученный этим способом сокристалл создает смесь сокристалла полиморфной формы А и формы В.

5 На фиг. 24 показана порошковая рентгенограмма (ПРД) сокристалла соединения B-2 с адипиновой кислотой ("Соединение B-2 CoX").

Кривые термогравиметрического анализа для сокристаллов адипиновой кислоты и соединения B-2 ("Соединения B-2 CoX") показаны на фиг.25. На фигурах показана потеря адипиновой кислоты, начинающаяся при около 150°C в обоих сокристаллах.

10 Типовая термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии показана на фиг. 26 для сокристаллов соединения B-2 и адипиновой кислоты ("Соединение B-2 CoX").

ЯМР спектр твердого тела (тт-ЯМР) получают на спектрометре большого диаметра Bruker-Biospin 400 MHz Advance III, оборудованном датчиком Bruker-Biospin 4 mm HFX. Приблизительно 70 мг каждого образца пакуют в полнообъемные роторы Bruker-Biospin 15 4mm ZrO₂. Примеряют скорость вращения под магическим углом (ВМУ) обычно 12,5 кГц. Температуру головки датчика устанавливают 275°K для минимизации эффекта фрикционного нагревания во время вращения. Релаксационную задержку 30 с применяют во всех экспериментах. Время контакта СР ¹³C CPMAS эксперимента устанавливают 2 мс. Протонный импульс СР с линейным изменением (от 50% до 100%) применяют.

20 Сочетание Хартманна-Хана оптимизируют на внешнем ссыпочном образце (глицин). SPIHOL 64 расцепку применяют с уровнем сигнала приблизительно 100 кГц. Химический сдвиг привязывают к внешнему стандарту адамантана с его резонансом, направленным в область сильного поля, устанавливают на 29,5 ч./млн. после промывки растворителем тт-ЯМР применяют для исследования комплексов сокристалла соединения B-2 с адипиновой кислотой ("Соединение B-2 CoX"). См. фиг. 27.

25 Получение полиморфной формы А сокристалла адипиновой кислоты и соединения B-2: 322 мг смеси формы А и формы В сокристалла соединения B-2 CoX:адипиновой кислоты получают как описано выше, и 221 мг адипиновой кислоты перемешивают в 9,8 г ацетона при 20-30°C в течение 30 дней. Приблизительно 50 мг твердого вещества выделяют фильтровальным центрифугированием через 0,45 мкм мембранный фильтр с применением центрифужного фильтровального устройства и сушат в вакууме при 20-30°C в течение приблизительно 2 часов. Спектр ¹³C ЯМР формы А сокристалла адипиновой кислоты и соединения B-2 показана на фиг.28.

30 35 Получение полиморфной формы В сокристалла адипиновой кислоты и соединения B-2: Смесь растворителей для сушки распылением получают взвешиванием 50 г метанола и 117,5 г дихлорметана в стеклянной бутылке и встряхивают. 500 мг соединения B-2, 176,2 мг адипиновой кислоты и 19,3 г смеси метанола с дихлорметаном взвешивают в прозрачной стеклянной пробирке и перемешивают до растворения всех твердых веществ. Этот раствор сушат распылением с применением распылительной минисушилки Buchi 40 B-290 с применением следующих уставок:

Параметр	Уставка
Темп. входа	99°C
Аспиратор	100%
Насос	40%
Конденсатор	-5°C
Форсунка	
Распылитель	
Давление фильтра	-60 мбар

Выделенный продукт полностью перекристаллизовывают при комнатной температуре до формы В сокристалла соединения B-2:адипиновой кислоты в течение более 2 месяцев.

Спектр ^{13}C ЯМР формы В сокристалла адипиновой кислоты и соединения B-2 показана на фиг. 29.

Суспензия сокристалла соединения B-2 и адипиновой кислоты: набор с однократной дозой суспензии получают с порошком "Соединением B-2 CoX" (которое является 2:1 молярным соотношением сокристалла соединения B-2:адипиновой кислоты, смесь формы А и формы В) и носителем, дозу доводят до 8 мг/мл (дозы <300 мг) или 50 мг/мл (дозы ≥ 300 мг). Носитель содержит 0,5% метилцеллюлозы (масса/объем [масс./об.]), 0,1% бензоата натрия, 0,1% бензойной кислоты. Полипропиленовые бутылки и полиэтиленовыми крышками применяют для диспергирования порошка и носителя. Загружают порошок соединения B-2 CoX с дополнительным стабилизатором на основе адипиновой кислоты, в виде порошка в контейнерах, с двумя аликвотами дозирующего носителя (0,5% метилцеллюлозы, 0,1% бензоата натрия, 0,1% бензойной кислоты). Одну аликвоту носителя добавляют в контейнер с порошком, и смесь встряхивают для супензирования. Дополнительную аликвоту носителя применяют для промывания контейнеров еще раз.

Пэгилированный липосомальный Доксорубицин (ПЛД): ПЛД в виде флакона для однократного применения: 20 мг/10 мл. Разбавленный ПЛД хранят в холодильнике при 2-8°C.

Пример 2: Действие длительности и времени воздействия соединения B-2 на сенсибилизацию клеток рака легкого A549 гидрохлоридом доксорубицина

Колонии клеток, реагенты, оборудование, программа: Колонию клеток рака легкого человека A549 (CCL-185) получают от американской коллекции типовых культур (ATCC; Manassas, VA). Соединение B-2, применяемое в этих экспериментах, не получено в виде сокристалла. 10 мМ исходный раствор соединения B-2 получают в ДМСО (кatalожный № ATCC 4-X) и хранят при -20°C. Гидрохлорид Доксорубицина (dox) получают от Sigma (St. Louis, MO) (кatalожный № D1515), растворяют в ДМСО до 10 мМ концентрации и хранят при -20°C.

Клеточная культура: колонию клеток рака легкого человека A549 культивируют в DMEM (Life Technologies, каталожный №11995) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, каталожный № SH30071.03), 1× GlutaMAX (Life Technologies, каталожный №35050-061), пирувата (Life Technologies, каталожный №11360-070) и 1× пенициллина/стрептомицина (Life Technologies, каталожный №15070) (полная среда).

Клетки выдерживают в суб-конфлюентном состоянии пассированием каждые 3-4 дня. Клетки помещают в количестве 1000 клеток на лунку в 96-луночный микропланшет с прозрачным дном (Corning, каталожный №3904) и инкубируют при 37°C, в присоединенном 5% CO₂ инкубаторе в течение ночи до добавления соединения.

Treatment with Соединение B-2 and Доксорубицин hydrochloride: Десяти мМ исходные растворы соединения B-2 и гидрохлорида доксорубицина получают в ДМСО и добавляют в сочетании с высеванными клетками с применением цифрового диспенсера D300 (Tecan, Switzerland). Для этих экспериментов сочетания с соединением B-2 во всех концентрациях пропускают один раз с применением комбинированной матрицы, в которой соединение B-2 добавляют в виде титрования от 20 мкМ до 0,1 мкМ на X-оси планшета и гидрохлорида доксорубицина, добавленном в 2-кратном разведении от 80 нМ до 0,125 нМ на 6 день и 24 часа экспериментов совместного инкубирования и 8 нМ до 0,0125 нМ в течение оставшегося эксперимента на Y-оси. Один ряд содержит титрование только соединения B-2, и одна колонка содержит только титрование

гидрохлорида доксорубицина. Две колонки клеток применяют в качестве контроля без обработки, из которого определяют фракционное выживание обработанных клеток. Клетки культивируют при 37°C, 5% CO₂, 95% воздухе и 100% относительно влажности.

5 Время добавления соединения, вымывание соединений из лунок планшета и повторное добавление гидрохлорида доксорубицина показано на фиг. 1. Коротко, среду из всех лунок в планшете удаляют вручную с применением мультипипетки, добавляют свежую среду (без соединения), затем снова удаляют и затем свежую среду добавляют последний раз. Повторное добавление гидрохлорида доксорубицина, где указано, проводят с применением HP D300 как показано на фиг. 1. Через 24 ч все планшеты промывают 10 как описано выше и добавляют свежую среду (без соединения). Планшеты инкубируют в течение еще 5 дней (6 дней всего).

15 Анализ жизнеспособности клеток: Через шесть дней после первого добавления соединения 50 мкл CellTiterGlo (полученного по протоколу производителя) добавляют в каждую лунку планшетов для титрования соединения. Люминесценцию считывают на ридере люминесценции Pherastar FS (BMG Labtech, Offenberg, Germany) и эти значения используют для всех дальнейших анализов.

20 Методы вычислений: жизнеспособность клетки оценивают для матрицы гидрохлорида доксорубицина и концентраций соединения B-2 в серии экспериментов тестирования в различные моменты времени добавления соединения B-2 и длительности 25 воздействия соединения B-2. Данные из каждого из этих экспериментов анализируют отдельно. Стадии анализа каждого эксперимента описаны ниже.

25 1. Для каждой концентрации соединения B-2, EC₅₀ гидрохлорида доксорубицина рассчитывают с применением программы Prism. Затем идентифицируют концентрацию в матрице концентраций гидрохлорида доксорубицина, ближайшую к EC₅₀.

30 2. Ожидаемое ингибирование фракции с применением аддитивной модели рассчитывают для каждого сочетания концентрации соединения B-2 и концентрации гидрохлорида доксорубицина, ближайшей к соответствующей EC₅₀ доксорубицина (со стадии 1) с применением следующей формулы (Bliss CI (1939) The toxicity of poisons applied jointly. Ann Appl Boil 26:585-615):

$$I_{add} = I_x + I_y - I_x * I_y$$

35 где I_x является ингибированием фракции инкубированием клеток только с соединением B-2, I_y является ингибированием фракции инкубированием клеток только с гидрохлоридом доксорубицина и I_{add} является прогнозируемым ингибированием фракции инкубированием клеток с гидрохлоридом доксорубицина и соединением B-2 в аддитивной модели. Оценку независимости Bliss затем рассчитывают как разницу между наблюдаемым ингибированием и ингибированием с применением аддитивной модели.

40 3. Строят график оценки независимости к концентрации соединения B-2, и рассчитывают общую площадь под кривой (ППК) Bliss.

45 Рассчитывают ППК Bliss для EC₅₀ гидрохлорида доксорубицина, так как ожидается, что на эффективность гидрохлорида доксорубицина максимально влияет соединение B-2 рядом с этой концентрацией. Значения EC₅₀ для экспериментов с воздействием соединения B-2 в течение 4 часов не могут быть надежно рассчитаны из-за низкого ингибирования фракции для этих экспериментов, и поэтому для этих экспериментов не показывают ППК Bliss.

Результаты обработки клеток A549 гидрохлоридом Доксорубицина в течение 24

часов и соединением B-2 в течение 4, 8, 12 или 16 часов: ППК по Блиссу рассчитывают как описано выше. Результаты показаны в таблице 1. Похожие оценки получают при добавлении соединения B-2 одновременно с гидрохлоридом доксорубицина и воздействии Соединения B-2 на клетки в течение 24 часов (эксперимент А в таблице 1) или при добавлении соединения B-2 через 8 или 12 часов после добавления гидрохлорида доксорубицина (эксперименты С) и воздействии Соединения B-2 на клетки в течение 16 часов. Синергию также наблюдают для воздействия соединения B-2 в течение 12 часов или 8 часов, соответственно (эксперимент G, L), когда соединение B-2 добавляют в течение 12 или 16 часов после добавления гидрохлорида доксорубицина. Наоборот, воздействие соединения B-2 в течение 16 часов после гидрохлорида доксорубицина дает намного меньшую ППК Bliss (эксперимент В). Эти результаты показывают, что воздействие соединения B-2 в течение не более 8 часов во время последней половины 24-часовой обработки гидрохлоридом доксорубицина достаточно для синергии между гидрохлоридом доксорубицина и соединением B-2.

15

20

25

30

Таблица 1. Результаты анализа Bliss			
Время добавления (часы)	Длительность воздействия (часы)	ППК по Блиссу	Эксперимент*
0	24	728	A
0	16	101	B
8	16	710	C
0	12	HO	D
4	12	266	E
8	12	HO	F
12	12	415	G
0	8	71	H
4	8	49	I
8	8	12	J
12	8	124	K
16	8	323	L
0	4	HO	M
4	4	HO	N
8	4	HO	O
12	4	HO	P
16	4	HO	Q

HO - не определено; * см. фиг. 1

Итоги и заключения: В этом исследовании оценивают *in vitro* жизнеспособность клеток рака легкого A549, обработанных соединением B-2 в течение от 0 до 24 часов и гидрохлоридом доксорубицина в течение 24 часов. Данные в этом исследовании показали, что действие соединения B-2 во второй половине 24-часового периода и не более 8 часов достаточно для синергии. Эти данные согласуются с тем, что отложенное добавление соединения B-2 в течение вплоть до 12 часов после добавления гидрохлорида доксорубицина не снижает эффективность сочетания.

40

Пример 3: оценка соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в моделях ксенотрансплантата колонии клеток

Оценивают эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® (липосомальной инъекцией гидрохлорида доксорубицина) у самок голых мышей nu/nu (Charles River Laboratories, Wilmington, MA или Beijing Vital River Lab Animal Technology Company Limited, Beijing, China), которым имплантированы клетки HT-29, HCT 116, OVCAR-3, NCI-H1048 или NCI-H2126. Как описано ниже подробно, когда опухоли достигают приблизительно 200 mm^3 , мышам вводят DOXIL® (1,5, 3, 6 или 12 мг/кг)

отдельно или в сочетании с различными дозами и схемами. Значения % Т/С улучшаются для всех сочетаний DOXIL® (1,5, 3, 6 и 12 мг/кг) при всех дозах и схемах для соединения B-2 CoX. Несколько дней введения орс эквивалентны или превосходят один день введения др. во всех исследованиях, и нет различий между введением орс в течение 2, 5 3 или 4 дней.

Колонии клеток: Колонии клеток, применяемых в этом исследовании, перечислены в таблице 2 и представляют спектр опухолей, включая рак прямой и ободочной кишки, яичников, немелкоклеточный рак легких (НМКРЛ) и мелкоклеточный рак легких (МКРЛ). Колонии клеток получают из Американской коллекции типовых культур 10 (ATCC).

Таблица 2. Колонии клеток			
Колония клеток	Происхождение	Источник	Каталожный номер
HCT116	прямая и ободочная кишка	ATCC	CCL-247
HT-29	прямая и ободочная кишка	ATCC	HTB-38
15 OVCAR-3	яичники	ATCC	HTB-161
NCI-H2126	НМКРЛ	ATCC	CCL-256
NCI-H1048	МКРЛ	ATCC	PPL-5853

Соединение и композиции: Соединение B-2 CoX составляют в носителе, содержащем 0,5% метилцеллюлозу, в виде гомогенной суспензии перемешиванием при комнатной 20 температуре в течение 30 минут. Концентрация составляет 10 мг/мл, и ее вводят мышам перорально в течение 12 часов от получения в дозе 10 мл/кг.

Имплантация ксенотрансплантата колонии клеток и лечение: Колонии клеток HCT 116, HT-29 и OVCAR-3 культивируют в DMEM (Invitrogen №11995)+2 мМ глутамина (GlutaMAX, Invitrogen №35050-061)+10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone №SH30071-03), пируват (Invitrogen №11360-070) и пен/стреп (Invitrogen №15070-063). Колонии клеток NCI-H1048 и NCI-H2126 культивируют в среде DMEM/F12 (Invitrogen №11320-033) с добавлением 1% инсулина-трансферрина-селения (Invitrogen №51500-056), 10 нМ гидрокортизона (Sigma CAS 50-23-7), 10 нМ β-эстрадиола (Sigma CAS №50-28-2), 1% глюкозы (Invitrogen №35050-061), 1,5% HEPES (Invitrogen №15630-080), 10% 25 фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen №10090-141) и 1% пен/стреп (Invitrogen №15140-122). Клетки выращивают в T150 колбах, разделяют при 80-90% конфлюентности с 0,25% TrypLE Express (Invitrogen №12605-010) до тех пор, пока клетки не отделятся, 30 нейтрализуют полной средой и центрифугируют при 1000×g. Клетки промывают один раз физиологическим раствором с фосфатным буфером, центрифугируют при 1000×g и ресуспензируют в 1:1 смеси физиологического раствора с фосфатным буфером:Matrigel 35 Collagen HC (Becton Dickinson №354248) в концентрации 20 миллионов клеток/мл. Смесь (100 мкл) вводят подкожно в спинную боковую маммарную подушечку голых мышей nu/nu. Мышей произвольно делят на группы до начала исследования, когда объем опухоли составляет приблизительно 200 мм³. Лечимые группы (n=10) обычно включают 40 контрольный носитель, только DOXIL® и DOXIL® в сочетании с соединением B-2 CoX. В день лечения каждое животное получает DOXIL® BB за 16 ч до соединения B-2 CoX. Соединение B-2 CoX (ПО) затея вводят либо др. в 0 и 4 ч (схема А) либо орс в 0 ч (схема В). В некоторых исследованиях, соединение B-2 CoX вводят в течение 2 дней (орс ×2) 45 или в течение 4 дней (орс ×4), с перерывом 24 ч. Эти циклы повторяют один раз в неделю в течение двух недель. DOXIL® вводят либо BB, либо ВБ, и соединение B-2 CoX вводят ПО.

Лечение проводят в два цикла, с перерывом одну неделю, если не указано иначе. Концентрации доз для каждого исследования указаны в разделе результатов. Мышей

взвешивают и опухоли измеряют штангенциркулем два раза в неделю. Объем опухоли, выраженный в мм^3 , рассчитывают с применением уравнения $\text{Объем} = 0,5 \times L \times W^2$, где L и W самое длинное и самое короткое измерение опухоли, соответственно.

Противоопухолевую эффективность выражают как % T/C (изменение объема опухоли лечимой/изменение объема опухоли контрольной $\times 100\%$), а регресс выражают как % T/Ti (конечный объем опухоли/исходный объем опухоли $\times 100\%$). Данные собирают с помощью Gage Wedge (TAL Technologies, Inc.). Образцы крови собирают на карточки для сухой капли крови (СКК) (Perkin Elmer).

Масса тела: Массу тела записывают два раза в неделю во время измерения опухолей.

Критерии исключения: животных, которые умерли в результате причин, связанных с отсутствием лечения, исключают из всех анализов. Кроме того, любых умирающих животных или животных с прорвавшимися/изъязвленными опухолями умерщвляют до конца исследования.

Анализ данных: процентные значения лечение/контроль (%T/C) рассчитывают с применением следующей формулы: % T/C = $100 \times \Delta T / \Delta C$ (измерение ингибирования роста опухоли), где: T=средний объем опухоли леченной лекарством группы на день окончания группы с носителем; ΔT =(средний объем опухоли леченной лекарством группы на день окончания группы с носителем)- (средний объем опухоли леченной лекарством группы на день лечения 0); C=средний объем опухоли контрольной группы на день окончания группы с носителем; ΔC =(средний объем опухоли контрольной группы на день окончания группы с носителем)- (средний объем опухоли контрольной группы на день лечения 0). Процент конечной опухоли/исходной опухоли (% T/Ti) рассчитывают с применением следующей формулы: конечный объем опухоли/исходный объем опухоли $\times 100\%$, где: T=конечный объем опухоли (средний объем опухоли леченной лекарством группы на день окончания группы с носителем); Ti=исходный объем опухоли (средний объем опухоли на начало исследования).

Статистический анализ: непарный, двусторонний непараметрический t-критерий (тест Манна-Уитни) проводят с применением программы GraphPad Prism в день умерщвления группы с носителем. Статистическую значимость определяют как $P < 0,05$.

Результаты эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в ксенотрансплантатах опухолей HT-29: модель ксенотрансплантата колонии клеток HT-29 применяют для оценки эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL®. Самок голых мышей nu/nu с имплантируемыми клетками HT-29 произвольно делят, когда опухоль достигает приблизительно 200 mm^3 . Лечимые группы ($n=10$) состоят из контрольного носителя, 3 мг/кг DOXIL®, 3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 4$, 6 мг/кг DOXIL®, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др., и 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 4$. Два цикла лечения проводят на день 0 и день 7.

Эффекты лечения и рассчитанные значения % T/C даны в таблице 3. Только DOXIL® ингибирует рост опухоли; однако нет статистической разницы между группами с дозами DOXIL® 3 мг/кг и 6 мг/кг. Не существует статистической разницы между группами 3 мг/кг DOXIL® и 3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 4$ ($P=0,62$), однако соединение B-2 CoX улучшает эффективность DOXIL® в дозе 6 мг/кг при введении орс $\times 4$ ($P=0,0068$). Хотя 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др. улучшает эффективность только 6 мг/кг DOXIL®, как показано значениями % T/C (22,1 и 44,7, соответственно), эта разница не является статистически значимой ($P=0,089$). Схема введения орс $\times 4$ соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® превосходит введение др. ($P=0,023$).

Таблица 3. Действие соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли НТ-29 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (день 20)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
3 мг/кг DOXIL®	10	49,9	Н/П
3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	40,0	Н/П
6 мг/кг DOXIL®	10	44,7	Н/П
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др.	10	22,1	-2,10 (день 15)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	3,6	-6,41 (день 15)

10 Н/П: не применяется

Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -6,41% на день 15 после лечения в комбинированной группе.

15 Эффективность Соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в ксенотрансплантатах опухолей НСТ 116: модель ксенотрансплантата колонии клеток НСТ 116 применяют для оценки эффективности ингибитора ДНК-ПК, соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® с применением того же протокола, как для ксенотрансплантатов опухолей НТ-29 выше.

20 Эффективность лечения и рассчитанные значения % T/C показаны в таблице 4. Только DOXIL® ингибирует рост; однако не существует статистической разницы между группами с дозой 3 мг/кг и 6 мг/кг DOXIL®. Нет статистической разницы между группами 3 мг/кг DOXIL® и 3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×4 (P=0,72), однако соединение B-2 CoX усиливает эффективность DOXIL® в дозе 6 мг/кг при 25 введении орс ×4 (P=0,0002). Хотя 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др. усиливает эффективность только 6 мг/кг DOXIL®, как показано значениями % T/C (24,6 и 36,0, соответственно), эта разница не является статистически значимой (P=0,16).

30 Таблица 4. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (день 21)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
3 мг/кг DOXIL®	10	41,1	Н/П
3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	23,3	-0,77 (день 13)
6 мг/кг DOXIL®	10	36,0	-2,91 (день 13)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др.	10	24,6	-0,67 (день 13)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	15,0	-2,72 (день 13)

35 Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -2,91% на день 13 после лечения в комбинированной группе.

40 Действие схемы соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в ксенотрансплантатах опухоли НСТ 116: Модель ксенотрансплантата опухоли НСТ 116 выбирают из дальнейшего изучения действия схемы и дозы соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL®. В этом исследовании изучается действие введения соединения B-2 CoX орс в течение 2, 3 и 4 дней после DOXIL®.

45 Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки НСТ 116, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 мм^3 . Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя, 100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4, 6 мг/кг DOXIL®,

6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×3 и 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4. Два цикла лечения проводят на день 0 и день 7.

Действия лечений и рассчитанные значения % T/C даны в таблице 5. Только DOXIL®

(6 мг/кг) ингибитирует рост опухоли, однако сочетание 6 мг/кг DOXIL®+соединение B-2 CoX орс ×2 еще больше ингибитирует рост ксенотрансплантатов опухоли НСТ 116 и эта разница статистически значима ($P<0,0007$). Хотя группы 6 мг/кг DOXIL®+соединения B-2 CoX орс ×3 и орс ×4 статистически отличались от группы 6 мг/кг DOXIL® ($P<0,02$), дополнительные дни введения соединения B-2 CoX далее не улучшают эффективность по сравнению со схемой введения орс ×2. Фактически, из трех схем введения соединения B-2 CoX, 6 мг/кг DOXIL®+соединение B-2 CoX орс ×2 дает наилучшие значения % T/C (8,3) по сравнению с орс ×3 и орс ×4 (17,0 and 17,1, соответственно). Эти данные позволяют предположить, что 2 дня соединения B-2 CoX достаточно для улучшения эффективности DOXIL®.

15

Таблица 5. Действие соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (день 19)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
100 мг/кг Соединение B-2 CoX орс ×4	10	106	Н/П
6 мг/кг DOXIL®	10	40,1	-0,49 (день 11)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×2	10	8,3	-4,4 (день 12)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×3	10	17,0	-6,49 (день 12)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×4	10	17,1	-5,32 (день 12)

Н/П: не применяется.

25 Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -6,49% на день 12 после лечения в комбинированной группе.

30 Дозозависимый эффект только DOXIL® и дозозависимый эффект соединения B-2 CoX в сочетании с 6 мг/кг DOXIL® в ксенотрансплантатах опухолей НСТ 116: дополнительные исследования проводят для определения дозозависимого эффекта только DOXIL® (1,5-6 мг/кг) в ксенотрансплантате опухоли НСТ 116. Далее дозозависимый эффект соединения B-2 CoX (25-100 мг/кг) в сочетании с 6 мг/кг DOXIL® также оценивают. Наконец, эффективность 1,5 мг/кг DOXIL® в сочетании с 200 мг/кг соединения B-2 CoX также оценивают.

35 Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки НСТ 116, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 mm^3 . Лечимые группы ($n=10$) состоят из контрольного носителя, 6 мг/кг DOXIL®, 3 мг/кг DOXIL®, 1,5 мг/кг DOXIL®, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 6 мг/кг DOXIL®+25 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 и 1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2. Два цикла лечения проводят в день 0 и день 7.

40 Рассчитанные значения % T/C даны в таблице 6. Дозозависимый эффект наблюдается только с DOXIL® со значениями % T/C 30, 55,1 и 61,5 для групп 6, 3 и 1,5 мг/кг DOXIL®, соответственно. Группа 6 мг/кг DOXIL® статистически отличается от групп 3 и 1,5 мг/кг ($P<0,02$), гл группы 3 и 1,5 мг/кг не отличаются ($P=0,67$). В этом исследовании группа 6 мг/кг DOXIL® не отличается статистически от любой из трех исследованных комбинированных групп. Однако значения % T/C 20,0, 26,7 и 35,9 для комбинированных

групп 100, 50 и 25 мг/кг соединения B-2 CoX+6 мг/кг DOXIL® показывают улучшенную эффективность при более высоких дозах соединения B-2 CoX. 1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX ингибирует рост опухоли больше, чем 1,5 мг/кг DOXIL®, как очевидно из значений % T/C (39,8 и 61,5, соответственно), но эта разница не является статистически значимой (P=0,089).

5 Таблица 6. Действие соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (день 19)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
6 мг/кг DOXIL®	10	30	Н/П
3 мг/кг DOXIL®	10	55,1	Н/П
1,5 мг/кг DOXIL®	10	61,5	Н/П
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×2	10	20,0	-1,92 (День 5)
6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×2	10	26,7	Н/П
6 мг/кг DOXIL®+25 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×2	10	35,9	Н/П
1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединение B-2 CoX орс ×2	10	39,8	Н/П

10 Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -1,92% на день 5 после лечения комбинированной группе 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX. Все другие группы показали повышение 15 массы тела в курсе лечения.

20 Результат повторного исследования дозы и схемы соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в мышиной модели ксенотрансплантата НСТ 116. Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки НСТ 116, произвольно делят на группы, когда 25 опухоли достигают примерно 200 мм³. Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя, 6 мг/кг DOXIL®, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4, 6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4, 1,5 мг/кг DOXIL®, 1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 и 1,5 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2. Два цикла лечения проводят в день 0 и день 7.

30 Эффект лечения и рассчитанные значения % T/C даны в таблице 7. Комбинированное лечение 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 и орс ×4 улучшает эффективность и статистически отличается от групп только с 6 мг/кг DOXIL® (P<0,04). Как видно ранее, не существует разницы между группами 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 и орс ×4 (P=0,57), и также не существует разницы между 35 группами 6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 и орс ×4 (P=0,67). Дополнительно, как видно ранее, не существует разницы между группой 6 мг/кг DOXIL® и группами 6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 или орс ×4 (P>0,28). В дозе 1,5 мг/кг DOXIL®, сочетание с 200 мг/кг соединения B-2 CoX демонстрирует 40 статистически значимое улучшение только DOXIL®, однако доза 100 мг/кг соединения B-2 CoX не демонстрирует. Эти данные подтверждают предыдущие исследования в том, что дозирование орс ×2 так же эффективно, как схема орс ×4.

45 Таблица 7. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (День 20)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
6 мг/кг DOXIL®	10	28,5	-2,27 (День 16)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	13,0	-4,96 (День 13)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	15,4	-6,18 (День 13)

6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	23,9	-6,18 (День 13)
6 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	26,6	-3,70 (День 16)
1,5 мг/кг DOXIL®	10	78,1	Н/П
1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	42,2	Н/П
1,5 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	62,8	Н/П

5 Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -6,18% на день 13 после лечения в комбинированной группе.

10 Исследование действия дозы соединения B-2 CoX в сочетании с 3 мг/кг DOXIL® в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116: Дозу 3 мг/кг DOXIL® исследуют в сочетании с интервалом доз соединения B-2 CoX (50-200 мг/кг) для идентификации реакции ксенотрансплантатов опухолей НСТ 116 на эти сочетания.

15 Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки НСТ 116, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 мм^3 . Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя, 3 мг/кг DOXIL®, 3 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, 3 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 и 6 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2. Два цикла лечения проводят в день 0 и день 7.

20 25 Действие схем лечения и рассчитанные значения % T/C даны в таблице 8. Только DOXIL® (3 мг/кг) ингибирует рост опухоли. Комбинированные группы 50 и 100 мг/кг соединения B-2 CoX значительно не улучшают действие только DOXIL® (P>0,84); однако при 200 мг/кг наблюдается статистически значимое улучшение DOXIL® (P=0,019). Эффективность 3 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 сравнима с эффективностью, наблюдаемой для 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2, что подтверждается значениями % T/C 16,6 и 20,9, соответственно.

Таблица 8. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (День 19)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		увеличение
3 мг/кг DOXIL®	10	34,8	-3,55 (День 8)
3 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	33,9	-3,56 (День 8)
3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	35,1	-2,84 (День 8)
3 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	16,6	-4,43 (День 8)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	20,9	-5,29 (День 12)

30 35 Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -5,29% на день 12 после лечения в комбинированной группе.

40 Результаты исследования действия дозы соединения B-2 CoX в сочетании с 12 мг/кг DOXIL® в модели ксенотрансплантата опухоли НСТ 116: DOXIL® в дозе 12 мг/кг ($36 \text{ мг}/\text{м}^2$) исследуют в сочетании с 25 или 50 мг/кг соединения B-2 CoX для идентификации реакции ксенотрансплантатов опухоли НСТ 116 на эти сочетания.

45 50 Модель ксенотрансплантата колонии клеток НСТ 116 применяют для оценки эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL®. Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки НСТ 116, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 мм^3 . Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя,

12 мг/кг DOXIL®, 12 мг/кг DOXIL®+25 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$, 12 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$, 6 мг/кг DOXIL® и 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX. Мыши во всех группах 12 мг/кг DOXIL® теряют 6-7% массы тела в среднем на день 2. В результате, HydroGel (приблизительно 0,5 унций на клетку) 5 дают *ad libitum* всем исследуемым группам в дни 2, 7 и 9.

Рассчитанные значения % T/C даны в таблице 9. Только DOXIL® (6 и 12 мг/кг) ингибирует рост опухоли. Соединение B-2 CoX в дозе 50 мг/кг, но не 25 мг/кг, значительно улучшает действие только 12 мг/кг DOXIL® (P=0,028, 0,57, соответственно). Эффективность 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$ сравнима с 10 эффективностью, наблюдавшейся в предшествующих исследованиях и демонстрирует статистически значимую разницу с только 6 мг/кг DOXIL® (P=0,023).

Таблица 9. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли HCT 116 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (День 19)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10	Н/П	-4,2 (День 2)
12 мг/кг DOXIL®	10	21,3	-9,4 (День 8)
12 мг/кг DOXIL®+25 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$	10	19,3	-6,5 (День 8)
12 мг/кг DOXIL®+50 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$	10	10,8	-7,4 (День 8)
6 мг/кг DOXIL®	10	31,7	-4,8 (День 8)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$	10	18,5	-5,9 (День 2)

Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей. Однако HydroGel применяют для минимизации потери веса, в частности, в группах 12 мг/кг DOXIL®. Важно, увеличение потери массы тела не наблюдается при объединении 25 соединения B-2 CoX с 12 мг/кг DOXIL®. Группа только 12 мг/кг DOXIL® демонстрирует наибольшую потерю веса из всех групп (-9,4% на день 8).

Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в ксенотрансплантатах опухолей OVCAR-3: Модель ксенотрансплантата колонии клеток OVCAR-3 применяют для оценки эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL®. Самок голых мышей *nu/nu*, которым имплантированы клетки OVCAR-3, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 mm^3 . Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя, 100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 4$, 6 мг/кг DOXIL®, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 4$, 1,5 мг/кг DOXIL® в течение 3 циклов, 1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$ и 1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$ (три цикла). Два цикла лечения проводят на день 0 и день 7, если не указано иначе (третий цикл инициируют на день 14 для одной из групп 1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$ groups).

Действие лечения и рассчитанные значения % T/C даны в таблице 10. Только DOXIL® (6 мг/кг) ингибирует рост опухоли, и добавление 100 мг/кг соединения B-2 CoX, вводимого в течение 2 дней или 4 дней, дальше подавляют рост опухоли. Не существует статистической разницы между группами орс $\times 2$ и орс $\times 4$ (P=0,19). Рост опухоли также ингибируется при 1,5 мг/кг DOXIL® в течение трех циклов и статистически отличается от группы носителя (P=0,0007). Добавление 200 мг/кг соединения B-2 CoX далее подавляет рост опухоли при введении двумя или тремя циклами, что подтверждается % T/C 33,6 и 20,0, соответственно.

Таблица 10. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели

ксенотрансплантата опухоли OVCAR3 у голых мышей			
Лечение	N	%T/C (День 43)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	83,2	Н/П
6 мг/кг DOXIL®	10	26,0	Н/П
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	10,2	Н/П
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	13,3	-0,3 (День 13)
1,5 мг/кг DOXIL® (три цикла)	10	43,7	Н/П
1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2	10	33,6	Н/П
1,5 мг/кг DOXIL®+200 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×2 (три цикла)	10	20,0	Н/П

10 Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -0,3% на день 13 после лечения в комбинированной группе.

15 Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в ксенотрансплантатах опухоли NCI-H1048: Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки NCI-H1048, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 мм^3 . Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя, 3 мг/кг DOXIL®, 3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4, 6 мг/кг DOXIL®, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др. и 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4. 20 Два цикла лечения проводят в день 0 и день 7.

25 Действие лечения и рассчитанные значения % T/C даны в таблице 11. Только DOXIL® ингибирует рост опухоли дозозависимым образом. Также нет статистической разницы между группами 3 мг/кг DOXIL® и 3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4 (P=0,075), однако соединение B-2 CoX улучшает эффективность DOXIL® при 6 мг/кг при введении орс ×4 (P=0,0002). Режим 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др. не улучшает эффективность только 6 мг/кг DOXIL®, как показано значениями % T/C (20,0 и 21,7, соответственно) и отсутствие статистической разницы (P=0,67). Схема введения орс ×4 соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® превосходит введение др. 30 (P=0,0001).

Таблица 11. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли NCI-H1048 у голых мышей			
Лечение	N	%T/C (День 15)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		Н/П
3 мг/кг DOXIL®	10	45,5	-2,23 (День 4)
3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	32,0	-1,26 (День 9)
6 мг/кг DOXIL®	10	21,7	-1,62 (День 4)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др.	10	20,0	-4,58 (День 4)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	2,3	-7,55 (День 12)

40 Н/П= не применяется.

Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -7,55% на день 12 после лечения в комбинированных группах.

45 Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в ксенотрансплантатах опухоли NCI-H2126: Самок голых мышей nu/nu, которым имплантированы клетки NCI-H2126, произвольно делят на группы, когда опухоли достигают примерно 200 мм^3 . Лечимые группы (n=10) состоят из контрольного носителя, 3 мг/кг DOXIL®, 3 мг/кг

DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4, 6 мг/кг DOXIL®, 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др. и 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4. Два цикла лечения проводят в день 0 и день 7.

Действие лечения и рассчитанные значения % Т/С даны в таблице 12. Только DOXIL®

5 ингибирует рост опухоли; однако нет статистически значимой разницы между группами с дозой 3 и 6 мг/кг ($P=0,063$). Соединение B-2 CoX (100 мг/кг орс ×4) улучшает эффективность 3 мг/кг DOXIL®, что подтверждается % Т/С (37,8 и 65,7, соответственно) и эта разница статистически значима ($P=0,0052$). % Т/С 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др. и орс ×4 (27,8 и 28,8, соответственно) улучшается по сравнению 10 с только 6 мг/кг DOXIL® (% Т/С=43,3), однако ни одно из этих сочетаний не было статистически отличны от группы с только DOXIL®.

Таблица 12. Эффект соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% Т/С) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли NCI-H2126 у голых мышей

Лечение	N	%Т/С (День 26)	Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	10		-0,97 (День 1)
3 мг/кг DOXIL®	10	65,7	-0,58 (День 4)
3 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	37,8	Н/П
6 мг/кг DOXIL®	10	43,3	-0,70 (День 11)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX др.	10	27,8	-0,41 (День 11)
6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс ×4	10	28,8	-1,75 (День 11)

Н/П: не применяется.

Массы тела измеряют два раза в неделю в течение исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей при максимальной потере веса -1,75% на день 11 после лечения в комбинированных 25 группах.

Обсуждение: Противоопухолевую эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® оценивают в колониях клеток HT-29, HCT 116, OVCAR-3, NCI-H1048 и NCI-H2126. Значения % Т/С для только DOXIL® варьируются 10,8-78,1, в зависимости от дозы и индивидуальной чувствительности колоний клеток. Значения % Т/С улучшены для всех сочетаний DOXIL® (в дозе 1,5, 3, 6 и 12 мг/кг) со всеми дозами и схемами соединения B-2 CoX, хотя не все сочетания статистически отличаются при сравнении с группой только DOXIL®. Несколько дней введения орс были равнозначны или превосходили один день введения др. во всех исследованиях, и не было разницы между введением орс в течение 2, 3 или 4 дней. Результаты, полученные в этих исследованиях, 35 показали, что соединение B-2 CoX улучшает эффективность DOXIL®.

Эти исследования на ксенотрансплантатах колоний клеток показали, что соединение B-2 CoX улучшает эффективность DOXIL® в 5 колониях клеток по всему спектру опухолей, и эти комбинированные схемы лечения хорошо переносятся.

Пример 4: Влияние соединения B-2 CoX на чувствительность панели первичных

40 опухолей яичников к ПЛД

Материалы: DOXIL® (Доксорубицин HCl липосомальная инъекция) является стерильной, прозрачной красной липосомальной дисперсией в стеклянном флаконе в концентрации 2 мг/ил, которая хранится при 2-8°C (Janssen Products, LP, Horsham, PA). Метилцеллюлоза (МЦ), 400сП, является белым порошком от Sigma-Aldrich (St. Louis, 45 MO), который хранится при температуре окружающей среды. Соединение B-2 CoX является белым или беловатым порошком, поставляемым Vertex Pharmaceuticals.

Соединение B-2 CoX имеет исходную молекулярную массу 415,39 с коэффициентом коррекции сокристалла (CoX) 1,27. Соединение B-2 CoX хранят при температуре

окружающей среды и защищают от света.

Носитель 0,5% МЦ готовят и хранят при 2-8°C и применяют в течение 8 дней после получения. До составления, 0,5% МЦ вынимают из места хранения и перемешивают при температуре окружающей среды в течение 30 минут. Подходящее количество 0,5%

5 МЦ добавляют к взвешенному количеству соединения B-2 CoX и перемешивают при температуре окружающей среды. Затем суспензию гомогенизируют в течение 15 минут при 5000 об./мин. и верхнюю часть гомогенизатора промывают 20% конечного объема носителя в шприце. Суспензию перемешивают в течение еще 30 минут перед дозированием. Оставшийся состав хранят при 4-8°C в течение вплоть до восьми дней

10 и перемешивают при температуре окружающей среды за 30 минут до дозирования.

Голыми мышами NCr являются *Mus musculus* от Taconic Laboratories (Hudson, NY, USA).

Исследование эффективности: *in vivo* противоопухолевое действие соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® оценивают в скрининг-панели из 5 моделей подкожных

15 ксенотрансплантатов первичного рака яичников (CTG-0253, CTG-0486, CTG-0964, CTG-1166 и CTG-1423). Эти исследования проводят для оценки способности селективного ингибитора ДНК-ПК, соединения B-2 CoX, улучшать противоопухолевое действие DOXIL®. Соединение B-2 CoX вводят отдельно или в сочетании с DOXIL®. Два цикла лечения вводят, и объемы опухолей и массу тела записывают два раза в неделю.

20 Модели ксенотрансплантатов рака яичников изначально получают из хирургически иссеченных клинических образцов. Самкам безтимусных голых мышей NCr имплантируют подкожно в боковую область живота фрагменты опухоли CTG-0253, CTG-0486, CTG-0964, CTG-1166 или CTG-1423. Эту панель из 5 опухолей яичников исследуют для идентификации отвечающих клеток.

25 Применяют три группы мышей, где мышей (n=4/группу) лечат носителем, 6 мг/кг/дозой DOXIL® BB OPH или 6 мг/кг/дозой DOXIL®+100 мг/кг/дозой соединения B-2 CoX как изображено на фиг. 2. DOXIL® вводят внутривенно (BB) и через 16 часов перорально (ПО) вводят соединение B-2 CoX в течение 4 последующих дней с интервалом 24 ч. Этот цикл повторяют дважды, с интервалом одна неделя. Опухоли измеряют

30 штангенциркулем и массу тела мышей записывают два раза в неделю. Объем опухоли, выраженный в мм^3 , рассчитывают с применением уравнения $\text{Объем} = 0,52 \times L \times W^2$, где L и W наибольшее и наименьшее измерения опухоли, соответственно. Противоопухолевое действие выражают в % T/C (изменение объема опухоли леченной/изменение объема опухоли контрольной $\times 100\%$), а регрессию выражают как % T/T_i (конечный объем

35 опухоли/исходный объем опухоли $\times 100\%$). непарный, двусторонний непараметрический t-критерий (тест Манна-Уитни) проводят с применением программы GraphPad Prism в день умерщвления группы с носителем. Дополнительно статистический анализ проводят с применением данных вплоть до последнего дня измерения объемов опухолей для всех 3 групп. Статистические сравнения объемов опухолей проводят с применением

40 однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) проводят критерием множественного сравнения Даннетта. Статистическую значимость определяют как Р<0,05.

Таблица 13. Модель исследования эффективности у имеющих опухоль мышей NCr для моделей CTG-0253, 0486, 0964, 1166 и 1423

Группа	n	Агент	Доза* (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Путь	Режим введения	Всего № доз
1	4	0,5% МЦ	0	10	ПО	(OPC×4/нед)×2	8
2	4	DOXIL®	6	10	BB	OPH×2	2
3	4	DOXIL® + соединение B-2 CoX	6 100	10	BB ПО	OPH×2 (OPC×4/нед)×2	8

*Обе дозы DOXIL® вводят за 16 часов до последующего введения соединения B-2 CoX.

Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в модели

5 ксенотрансплантата первичного рака яичников CTG-0253: В модели CTG-0253, DOXIL® задерживает рост опухоли (% T/C 6,9) и эта задержка роста усиливается при объединении с 100 мг/кг соединения B-2 CoX (% T/Ti 69,1; фиг. 3; таблица 14). Для всех дозированных групп, лечение хорошо переносится, что подтверждается максимальной потерей массы тела в комбинированной группе -3,8% на День 13 (фиг. 4, таблица 14).

Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в модели

10 ксенотрансплантата первичного рака яичников CTG-0486: В модели CTG-0486, только DOXIL® минимально влияет на рост опухоли (% T/C 72,3) или в сочетании с 100 мг/кг соединения B-2 CoX (% T/C 97,4; фиг. 5; таблица 14). Для всех дозированных групп, лечение хорошо переносится, так как у мышей во всех лечебных группах масса тела возрастает в течение исследования (фиг. 6, таблица 14).

15 Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в модели ксенотрансплантата первичного рака яичников CTG-0964: В модели CTG-0964, DOXIL® задерживает рост опухоли (% T/C 50,1) и эта задержка роста усиливается при объединении с 100 мг/кг соединения B-2 CoX (% T/Ti 34,1; фиг. 7; таблица 14). В День 26, когда группу носителя заканчивают, комбинированная группа статистически 20 отличается от группы носителя (P=0,029), но не от группы только DOXIL® (P=0,49). Для всех дозированных групп, лечение хорошо переносится, так как у мышей во всех лечебных группах масса тела возрастает в течение исследования (фиг. 8, таблица 14).

25 Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в модели ксенотрансплантата первичного рака яичников CTG-1166: Первые две дозы соединения B-2 CoX во время второго цикла лечения DOXIL® не дают в модели CTG-1166. Тем не менее, DOXIL® задерживает рост опухоли (% T/C 32,7) и эта задержка роста усиливается при объединении с 100 мг/кг соединения B-2 CoX (% T/Ti 9,4; фиг. 9; таблица 14). В День 37, когда группу носителя заканчивают, комбинированная группа статистически 30 отличается от группы носителя (P=0,029). Для всех дозированных групп, лечение хорошо переносится, что подтверждается максимальной потерей массы тела в комбинированной группе -0,01% на День 8 (фиг. 10, таблица 14).

35 Эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® в модели ксенотрансплантата первичного рака яичников CTG-1423: В модели CTG-1423 DOXIL® задерживает рост опухоли (% T/C 44,5) и эта задержка роста усиливается при объединении с 100 мг/кг соединения B-2 CoX (% T/Ti 27,6; фиг. 11; таблица 14). В День 28, когда группу носителя заканчивают, комбинированная группа статистически отличается от группы носителя (P=0,029). Для всех дозированных групп, лечение хорошо переносится, что подтверждается максимальной потерей массы тела в комбинированной 40 группе -12,1% на День 9 (фиг. 12, таблица 14).

40 Таблица 14. Действие соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® на ингибирование роста опухоли (% T/C или % T/Ti) и массу тела в модели ксенотрансплантатов первичной опухоли яичников у голых мышей

Модель ксенотрансплантата опухоли (День окончания группы носителя)	Лечение	N	% T/C	% T/Ti	Макс. потеря массы тела (%)
45 CTG-0253 (День 23)	Носитель	4	--	--	Н/П (не применяется)
	6 мг/кг DOXIL®	4	6,9	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX опр. $\times 4$	4	--	69,1	-3,8 (День 13)
CTG-0486 (День 28)	Носитель	4	--	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®	4	72,3	--	Н/П

	6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX опр ×4	4	97,4	--	Н/П
5 CTG-0964 (День 26)	Носитель	4	--	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®	4	50,1	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX опр ×4	4	34,1	--	Н/П
10 CTG-1166 (День 37)	Носитель	4	--	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®	4	32,7	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX опр ×4	4	9,4	--	-0,01 (День 8)
15 CTG-1423 (День 28)	Носитель	4	--	--	Н/П
	6 мг/кг DOXIL®	4	44,5	--	-0,02 (День 6)
	6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2 CoX опр ×4	4	27,6	--	-12,1 (День 9)

Обсуждение n: соединение B-2 CoX в дозе 100 мг/кг в сочетании с DOXIL® хорошо переносится, и лечение дает улучшение противоопухолевого действия, что подтверждается улучшением значений % T/C в 4 из 5 описанных выше исследованных моделей по сравнению с только DOXIL®. Соединение B-2 CoX в сочетании с DOXIL® демонстрирует статистически значимое (однофакторный ANOVA) противоопухолевое действие в курсе исследования по сравнению с только DOXIL® в 2 из 5 исследованных моделях (CTG-0253 и CTG-1166). Эти данные подтверждают дальнейшее исследование соединения B-2 CoX в сочетании с DOXIL® для лечения солидных опухолей.

20 Пример 5: Эффективность DOXIL® с и без соединения B-3 в ксенотрансплантатах НСТ 116

Так же как в способах с применением ксенотрансплантата, описанных в предыдущих примерах, модель ксенотрансплантата колонии клеток НТ-29 применяют для оценки эффективности соединения B-3 в сочетании с DOXIL®. Соединение B-3, применяемое в этих экспериментах, не получают в виде сокристалла. Лечимые группы (n=5) включают контрольный носитель, 15 мг/кг DOXIL®, 15 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-3 др., 6 мг/кг DOXIL® один раз в неделю в течение 2 циклов и 6 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-3 др. один раз в неделю в течение 2 циклов. В дни лечения каждая мышь получает DOXIL® за 16 ч до соединения B-3. На фиг. 13 и фиг. 14 показан объем опухоли и изменение массы тела, соответственно.

25 Пример 6: Эффективность DOXIL® и соединения B-2, вводимых в ксенотрансплантатах в Н460

Так же как в способах с применением ксенотрансплантата, описанных в предыдущих примерах, модель ксенотрансплантата Н460 применяют для оценки эффективности соединения B-2 в сочетании с DOXIL®. Соединение B-2, применяемое в этих экспериментах, не получают в виде сокристалла. Четыре группы (носитель, 1 мг/кг DOXIL® (ВБ введение), 100 мг/кг соединения B-2 (ПО введение), 1 мг/кг DOXIL®+100 мг/кг соединения B-2) исследуют в ксенотрансплантатах Н460. Соединение B-2 вводят в около 0 ч и около 4 часов, и DOXIL® в около 15 минут. Режим обеспечивают два раза в неделю в Дни 1 и 4. Объем опухоли и массы тела измеряют так, как в способах, описанных в других примерах. Кровь собирают из щеки и помещают на карты сухой капли крови для анализа ФК. На фиг. 15 и 16 показано действие соединения B-2 при совместном введении одновременно в один день с DOXIL® на объем опухоли и массу тела в мышной модели ксенотрансплантата.

40 Пример 7: Оценка соединения B-2Co-X в сочетании с DOXIL® в моделях ксенотрансплантата первичной опухоли эндометрия и яичников

Целью этого исследования является оценка эффективности ингибитора ДНК-ПК, соединения B-2 Co-X, в сочетании с пэгилированным липосомальным доксорубицином

(ПЛД, DOXIL®) у самок голых мышей NCr, имеющих импланты первичной опухоли эндометрия CTG-1280 и первичной опухоли яичников (CTG-0259).

Когда опухоли достигают приблизительно 200 мм^3 (для CTG-1280) или 180 мм^3 (для CTG-0259), мышей лечат ПЛД (6 мг/кг) q7d отдельно или в сочетании с соединением B-2 CoX в дозе 100 мг/кг орс×2 в течение 2 циклов. Для CTG-1280, сочетание ПЛД с соединением B-2 CoX дает регрессию опухоли (% T/Ti -51,5), а лечение только ПЛД вызывает ингибирование роста опухоли (% T/C 21,7). Для CTG-0259, сочетание ПЛД с соединением B-2 CoX дает ингибирование роста опухоли (% T/C 19,2), которое значительно отличается ($P<0,0355$) от лечения только ПЛД (% T/C 49). Эти данные подтверждают продолжение разработки соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД для лечения солидных опухолей.

Состав: соединение B-2 CoX составляют в носителе, содержащем 0,5% метилцеллюлозу в виде гомогенной суспензии перемешиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Соединение B-2 CoX получают в концентрации 10 мг/мл и вводят мышам перорально в объеме дозирования 10 мл/кг.

Способы: Модели ксенотрансплантата рака эндометрия изначально получают из хирургически иссеченных клинических образцов. Самкам безтимусных голых мышей NCr имплантируют подкожно в боковую область живота фрагменты опухоли CTG-1280. Мышей (n=5/группу) лечат носителем, 6 мг/кг ПЛД или 6 мг/кг ПЛД+100 мг/кг соединения B-2 CoX, как изображено на фиг. 17 и фиг. 18A-18B. ПЛД вводят ВВ и через 16 часов вводят соединение B-2 CoX ПО в течение 2 последующих дней с интервалом 24 ч. Этот цикл повторяют дважды с интервалом одна неделя. Опухоли измеряют штангенциркулем и массу тела мышей записывают два раза в неделю. Объем опухоли, выраженный в мм^3 , рассчитывают с применением уравнения $\text{Объем}=0,52 \times L \times W^2$, где L и W наибольшее и наименьшее измерения опухоли, соответственно. Противоопухолевое действие выражают в % T/C (изменение объема опухоли леченной/изменение объема опухоли контрольной $\times 100\%$), а регрессию выражают как % T/Ti (конечный объем опухоли/исходный объем опухоли $\times 100\%$). Непарный, двусторонний непараметрический t-критерий (тест Манна-Уитни) проводят с применением программы GraphPad Prism в день умерщвления группы с носителем.

Модели ксенотрансплантата рака яичников изначально получают из хирургически иссеченных клинических образцов. Самкам безтимусных голых мышей NCr имплантируют подкожно в боковую область живота фрагменты опухоли CTG-0259. Мышей (n=5/группу) лечат носителем, 6 мг/кг ПЛД или 6 мг/кг ПЛД+100 мг/кг соединения B-2 CoX, как изображено на фиг. 19A-19B. ПЛД вводят ВВ и через 16 часов вводят соединение B-2 CoX ПО в течение 2 последующих дней с интервалом 24 ч. Этот цикл повторяют дважды с интервалом одна неделя. Опухоли измеряют штангенциркулем и массу тела мышей записывают два раза в неделю. Объем опухоли, выраженный в мм^3 , рассчитывают с применением уравнения $\text{Объем}=0,52 \times L \times W^2$, где L и W наибольшее и наименьшее измерения опухоли, соответственно. Противоопухолевое действие выражают в % T/C (изменение объема опухоли леченной/изменение объема опухоли контрольной $\times 100\%$), а регрессию выражают как % T/Ti (конечный объем опухоли/исходный объем опухоли $\times 100\%$). Непарный, двусторонний непараметрический t-критерий (тест Манна-Уитни) проводят с применением программы GraphPad Prism в день умерщвления группы с носителем.

Результаты эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД в ксенотрансплантатах опухолей эндометрия CTG-1280, полученных у пациентов: Модель

ксенотрансплантата CTG-1280 применяют для оценки эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД. Самок голых мышей NCr с имплантированными фрагментами CTG-1280 произвольно делят, когда опухоли достигают приблизительно 200 мм^3 .

Лечимые группы (n=5) включают контрольный носитель, 6 мг/кг ПЛД, 6 мг/кг ПЛД+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$. Два цикла лечения проводят в День 0 и День 7.

Действие лечения показано на фиг. 18А (верхний график), и рассчитанные значения % T/C или % T/Ti даны в таблице 15А. Лечение только ПЛД дает статистически значимое ингибирование роста опухоли по сравнению с группой носителя (P=0,0079). Соединение B-2 CoX улучшает эффективность ПЛД в дозе 6 мг/кг при введении орс $\times 2$ (% T/Ti -51,5, P<0,016) и вызывает регрессию опухоли. Массы тела измеряют два раза в неделю во время курса исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения у мышей вызывают максимальное изменение массы тела -4,3% в День 14 после лечения у одного животного в комбинированной группе (фиг. 18В, нижний график).

15 Таблица 15А. Действие соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли CTG-1280 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (День 18)	% T/Ti (День 18)	Средняя Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	5	Н/П	Н/П	Н/П
6 мг/кг ПЛД	5	21,7	Н/П	Н/П
6 мг/кг ПЛД+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$	5	Н/П	-51,5	Н/П*

20 Н/П: не применяется. * Примечание: одно животное в комбинированной группе имеет максимальное изменение массы тела -4,3%.

Результаты эффективности соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД в ксенотрансплантатах опухолей яичников CTG-0259, полученных у пациента:

25 Модель ксенотрансплантата CTG-0259 применяют для оценки эффективности ингибитора ДНК-ПК, соединения B-2 CoX, в сочетании с ПЛД. Самок голых мышей NCr с имплантированными фрагментами CTG 0259 произвольно делят, когда опухоли достигают приблизительно 180 мм^3 . Лечимые группы (n=5) включают контрольный носитель, 6 мг/кг ПЛД, 6 мг/кг ПЛД+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$. Два цикла 30 лечения проводят в День 0 и День 7.

Действие лечения показано на фиг. 19А-19В, и рассчитанные значения % T/C или % T/Ti даны в таблице 15В. Лечение только ПЛД дает статистически значимое ингибирование роста опухоли по сравнению с группой носителя. Соединение B-2 CoX улучшает эффективность ПЛД в дозе 6 мг/кг при введении орс $\times 2$ (% T/Ti -19,2, P<0,0355).

35 Массы тела измеряют два раза в неделю во время курса исследования для оценки переносимости лечения. В общем, эти режимы введения хорошо переносятся у мышей со средней максимальной потерей массы тела 3,4% в День 7 после лечения; однако у одного животного в комбинированной группе максимальная потеря массы тела составляет 22%, и восстанавливается в течение времени (фиг. 19В).

40 Таблица 15В. Действие соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД на ингибирование роста опухоли (% T/C) и массу тела в модели ксенотрансплантата опухоли CTG-0259 у голых мышей

Лечение	N	% T/C (День 31)	% T/Ti (День 31)	Средняя Макс. потеря массы тела (%)
Носитель	5	100	Н/П	Увеличение массы
6 мг/кг ПЛД	5	49	Н/П	Увеличение массы
6 мг/кг ПЛД+100 мг/кг соединения B-2 CoX орс $\times 2$	5	19	Н/П	3,4

45 Н/П: не применяется. * Примечание: одно животное в комбинированной группе имеет максимальную потерю массы тела 22%.

Обсуждение: Противоопухолевая эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД оценивается в модели ксенотрансплантата полученной у пациента CTG-1280. Значение % T/C для только ПЛД составляет 21,7. Регрессия отмечается (% T/Ti -51,5) для сочетания ПЛД (в дозе 6 мг/кг) с соединением B-2 CoX (в дозе 100 мг/кг). Результаты, полученные в этих исследованиях, демонстрируют, что соединение B-2 CoX улучшает эффективность ПЛД.

Противоопухолевая эффективность соединения B-2 CoX в сочетании с ПЛД также оценивается в модели ксенотрансплантата полученной у пациента CTG-0259. Значение % T/C для только ПЛД составляет 49. Значительное ингибирование роста опухоли отмечается (% T/Ti 19,2) для сочетания ПЛД (в дозе 6 мг/кг) с соединением B-2 CoX (в дозе 100 мг/кг). Результаты, полученные в этих исследованиях, демонстрируют, что соединение B-2 CoX улучшает эффективность ПЛД.

Пример 8: Действие соединения B-1 или соединения B-2 на чувствительность клеток первичной опухоли к химиотерапевтическим агентам *in vitro*

Первичные опухоли человека, тестированные *in vitro*, могут являться дополнительным показателем клинической эффективности, лучшим чем умерщвленные колонии раковых клеток, благодаря повышенной гетерогенности и близости к опухоли пациента, из которой они получены. Целью следующих двух исследований является оценка степени реакции образцов первичной опухоли пациента на сочетание селективного ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) (соединения B-1 или соединения B-2) а и химиотерапевтических агентов. Соединение B-1 и соединение B-2, применяемые в этих экспериментах, не получают в виде сокристаллов.

Более конкретно, одно исследование описывает сочетание соединения B-2 и гидрохлорида доксорубицина. В этом исследовании панель первичных опухолей яичников и эндометрия человека диссоциируют и лечат соединением B-2 для определения эффективности этого селективного ингибитора ДНК-ПК для улучшения активности доксорубицина.

В другом исследовании описано сочетание соединения B-1 с радиацией, блеомицином, цисплатином, гидрохлоридом доксорубицина, гемцитабином, этопозидом, карбоплатином, поклитакселом или 5-фторурацилом (5-ФУ). В этом исследовании панель первичных опухолей человека (немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), рак поджелудочной железы, печеночно-клеточная карцинома (ПКК), рак желудка, рак пищевода) диссоциируют и обрабатывают соединением B-1 для определения эффективности селективного ингибитора ДНК-ПК для улучшения активности стандартных способов лечения, которые вызывают повреждение ДНК, включая радиацию, сульфат блеомицина, цисплатин, гидрохлорид доксорубицина, гемцитабин, этопозид, карбоплатин, поклитаксел и 5-фторурацил (5-ФУ).

В обоих исследованиях жизнеспособность клеток оценивают через 6 дней в культуре. Статистический анализ комбинированной матрицы проводят для оценки того, наблюдается ли синергия, аддитивность или антагонизм комбинированного лечения.

Материалы: Первичные образцы пациентов (см. таблицы 16 и 17 ниже) иссекают у мышей, когда они достигают размера от 500 мг до 1000 мг и обрабатывают сразу же или после отправки в течение ночи. Опухоли серийно пассируют подкожным имплантированием фрагментов от 50 мг до 150 мг в боковую часть живота мышей с ослабленным иммунитетом (голых). Опухоли применяют в пределах первых 5 или 7 пассажей.

Таблица 16. Информация о первичных опухолях

Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Гистологический подтип	Гистологическая форма
5	OD26131	Легкое-НМКРЛ	Плоскоклеточная карцинома
	OD33966	Легкое-НМКРЛ	Аденокарцинома
	OD26749	Легкое-НМКРЛ	Аденокарцинома
	OD29498	Легкое-НМКРЛ	Объемная не мелкоклеточная карцинома
	OD35982	Легкое-НМКРЛ	Плоскоклеточная карцинома
10	YAS111611	Легкое-НМКРЛ	Н/П
	OD36088	Легкое-НМКРЛ	Плоскоклеточная карцинома
	TS110310	Легкое-НМКРЛ	Н/П
	OD33117	Легкое-НМКРЛ	Плоскоклеточная карцинома
	LUX031	Легкое-МКРЛ	Мелкоклеточная нейроэндокринная карцинома
15	LUX013	Легкое-МКРЛ	Плоскоклеточная карцинома (мелкоклеточный подтип)
	P110408	Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома желчных протоков
	P110603	Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома желчных протоков
	P110504	Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома желчных протоков
	P110325	Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома желчных протоков
20	P110413	Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома желчных протоков
	P110323	Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома желчных протоков
	L090923	Печень-ПКК	Печеночно-клеточная карцинома
	GAX001	Рак желудка	Аденокарцинома
	GAX007	Рак желудка	Аденокарцинома
25	GAX027	Рак желудка	Аденокарцинома
	ESX005	Рак пищевода	Плоскоклеточная карцинома
	ESX008	Рак пищевода	Плоскоклеточная карцинома
			Хорошо дифференцированная
			Умеренно дифференцированная

Таблица 17. Информация о первичной опухоли

Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Гистологический подтип	Стадия болезни	Гистологическая форма
30	OVX001	Рак яичников	НО	НО
	CTG-0992	Рак яичников	Карцинома	НО
	CTG-1301	Рак яичников	Карцинома	НО
	CTG-0947	Рак яичников	Эпителиальная	НО
	CTG-0252	Рак яичников	Папиллярная серозная аденокарцинома	НО
35	CTG-0258	Рак яичников	Карцинома	НО
	CTG-0791	Рак яичников	Папиллярная серозная аденокарцинома	Плохо дифференцированная
	CTG-1423	Рак яичников	Смешанная эпителиальная карцинома	Плохо дифференцированная
	CTG-0253	Рак яичников	Папиллярная серозная аденокарцинома	Плохо дифференцированная

CTG-0486	Рак яичников	Папиллярная серозная аденокарцинома	III	НО
CTG-1166	Рак яичников	Папиллярная серозная аденокарцинома	ВВ	Плохо дифференцированная
ENX005	Рак эндометрия	НО	НО	НО
ENX001	Рак эндометрия	НО	НО	НО

Анализ химиочувствительности опухоли (АХО): Образцы первичной опухоли выращивают и серийно пассируют мышам с ослабленным иммунитетом. Опухоли механически диссоциируют на мелкие фрагменты (от 1 мм до 2 мм) скальпелями в

физиологическом растворе с фосфатным буфером (ФРФБ или RPMI) и центрифигируют при 200 $\times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре в 50 мл центрифужных пробирках. Образцы ресуспенсируют в 10 мл реагента для диссоциации клеток и ферментативно переваривают при механическом перемешивании в течение 1-3 часов 5 при 37°C, 5% CO₂ до одноклеточной супензии. Десять мл цельной среды RPMI-1640 добавляют к смеси клеток и пипетируют вверх и вниз 4-5 раз. Смесь затем пропускают через 70 мкм или 100 мкм сетчатый фильтр для удаления непереваренной опухоли. Затем фильтрат центрифигируют 200 $\times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре 10 и ресуспенсируют в 20 мкл цельной RPMI-1640. Эту клеточную супензию медленно расслаивают на 20 мл Histopaque при комнатной температуре и центрифигируют при 400 $\times g$ в течение 15 минут при комнатной температуре без перерыва. Поверхность раздела фаз переносят в новую 50 мл центрифужную пробирку и добавляют 15 мл 15 цельной RPMI-1640. Эту супензию центрифигируют при 200 $\times g$ при комнатной температуре, и полученную лепешку ресуспенсируют в 10 мл цельной среды PC-1, за исключением рака поджелудочной железы, для которого применяют среду для рака поджелудочной железы. Клетки разводят в Trypan blue, и жизнеспособные клетки, которые исключают краситель, считают. Только большие опухолевые клетки включают в расчет клеток. Клетки разводят в цельной PC-1 или среде для рака поджелудочной железы, как подходят для клеток, и помещают в количестве 15000-20000 клеток на 20 лунку в 100-135 мкл планшеты с U-образным дном с ультранизким присоединением.

Добавление соединения: Для этих исследований 10 мМ исходный раствор ингибитора ДНК-ПК (соединения B-1 или соединения B-2) готовят в ДМСО и применяют для добавления к клеткам из большинства опухолей с применением HP D300 Digital Dispenser (Tecan US, Morrisville, NC, USA), или разводят в подходящей среде (PC-1 или среде для рака поджелудочной железы) в виде 5-10 \times исходного раствора и добавляют к клеткам 25 (OVX001 и ENX001, 005). Также добавляют PC-1, среду для рака поджелудочной железы и химиотерапевтические агенты так, чтобы конечный объем составлял 150 мкл.

Доксорубицин готовят в виде исходного раствора в ДМСО 1 или 10 мМ и добавляют к клеткам для большинства опухолей с применением HP D300 Digital Dispenser, или 30 разводят в PC-1 в виде 5-10 \times исходного раствора и добавляют к клеткам (OVX001 и ENX001, 005). Цисплатин (цис-диаминплатину(II), дихлорид) готовят свежим до 10 мМ в теплой (60°C) дистиллированной воде и разводят в PC-1 в виде 5-10 \times исходного раствора. Блеомицин, этопозид, доксорубицин, гемцитабин, карбоплатин, паклитаксел 35 и 5-ФУ готовят в виде исходных растворов в ДМСО и разводят в PC-1 или среде для рака поджелудочной железы в виде 5-10 \times исходного раствора и добавляют к клеткам. Различные исходные концентрации, интервалы доз и количество доз применяют для каждого эксперимента, основываясь на данные реакции, доступных в этот момент времени.

Для экспериментов с гидрохлоридом доксорубицина, сочетания с соединением B-2 40 во всех концентрациях тестируют трижды. Матрицу 6 \times 3 создают в каждом планшете: 0,73 мкМ и 2,2 мкМ соединения B-2 или 0,37 мкМ и 4,4 мкМ соединения B-2 в некоторых опухолях, где доступны дополнительные клетки, плюс контроль без лечения, в трех столбцах, каждый из которых имеет 6 лунок. Гидрохлорид доксорубицина (плюс контроль 'без лечения') добавляют в 9 лунок в рядах этого планшета. Исходная 45 концентрация гидрохлорида доксорубицина вартируется; для OVX, исходная концентрация составляет 1 мкМ гидрохлорида доксорубицина, который разводят 1:3. Для оставшихся раков яичников, исходная концентрация составляет 5 мкМ гидрохлорида доксорубицина, который разводят 1:3, с 5 мкМ начального гидрохлорида доксорубицина

в одном планшете, продолжая до 0,021 мкМ начального гидрохлорида доксорубицина в другом планшете.

Для опухолей ENX, сочетания с соединением B-2 во всех концентрациях тестируют одинажды, в каждом из 3 идентичных планшетов. Матрицу 8×10 создают в каждом 5 планшете, так, что соединение B-2 тестируют при исходной концентрации 20 мкМ в одной колонке, и разводят 1,8× во всех 8 дополнительных колонках, где последняя колонка содержит ДМСО. Доксорубицин тестируют, начиная при 0,032 мкМ в одном ряду, и разводят 2× в 6 дополнительных рядах, где последний ряд содержит ДМСО.

В экспериментах с радиацией, интервал 1-16 Гр вводят с применением источника 10 цезия-137 (GammaCell 40 Exactor, MDS Nordion, Ontario, Canada). Эти эксперименты проводят в виде 6×5 матрицы трижды. Каждую точку 4-точечного интервала концентрации 0,15, 0,73, 1,5 и 2,2 мкМ соединения B-1 плюс контроль 'без лечения' трижды добавляют в 6 отдельных планшетов. Затем матрицу собирают облучением каждого планшета 0, 1, 2, 4, 8 или 16 Гр радиации.

15 Для экспериментов с блеомицином, сочетания с соединением B-1 во всех концентрациях проводят трижды. В одном планшете создают матрицу 6×3, состоящую из 2-точечного интервала концентрации 0,73 мкМ и 2,2 мкМ соединения B-1 плюс контроль без лечения, в 3 столбцах, каждый из которых содержит 6 лунок. Блеомицин (плюс контроль 'без лечения') добавляют в 9 лунок в рядах этого планшета. Подобные 20 6×3 матрицы создают для дополнительных агентов с разными исходными концентрациями для разведений соединения. Для экспериментов с цисплатином исходная концентрация составляет 30 мкМ, которую разводят 1:3. Для экспериментов с этопозидом, исходная концентрация составляет 50 мкг/мл этопозида, который разводят 1:2 для опухолей НМКРЛ, или 30 мкг/мл, которую разводят 1:3 для опухолей МКРЛ.

25 Для экспериментов с гидрохлоридом доксорубицина исходная концентрация составляет 5 мкМ доксорубицина, который разводят 1:3. Для экспериментов с гемцитабином исходная концентрация составляет 5 мкМ гемцитабина, который разводят 1:3. Для экспериментов с карбоплатином, исходная концентрация составляет 20 мкМ карбоплатина, который разводят 1:3. Для экспериментов с паклитакселом исходная 30 концентрация составляет 1 мкМ паклитаксела для GAX027, GAX007 и ESX005, и 20 мкМ паклитаксела для GAX001 и ESX008, который разводят 1:3. Для экспериментов с 5-ФУ исходная концентрация составляет 20 мкМ 5-ФУ для GAX027, GAX007 и ESX005, и 150 мкМ 5-ФУ для GAX001 и ESX008, который разводят 1:3.

35 Клетки культивируют при 37 °C, 5% CO₂, 95% воздуха и 100% относительной влажности.

Определение жизнеспособности: Через шесть дней после добавления соединения, 75 мкл CellTiterGlo (полученного по протоколу производителя) добавляют в каждую лунку титровальных планшетов с соединением. После пипетирования вверх и вниз 4-5 раз, 40 100-200 мкл переносят в 96-луночный планшет с белыми или черными стенками. Люминесценцию считывают либо на люминесцентном ридере Wallac 1450 MicroBeta liquid scintillation, Pherastar (BMG Labtech, Offenberg, Germany), либо на многоканальном ридере Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), и эти значения применяют для всех дальнейших анализов.

45 Анализ данных: Модель аддитивизма Блисса является стандартным статистическим способом идентификации синергии между двумя соединениями (Berenbaum, MC. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. Adv Cancer Res 1981; 35:269-335). Данные трансформируют следующим образом:

Нормализация: Каждую отдельную единицу данных делят на среднее значение

отрицательного контроля (лунки с отсутствием стандарта или лечащего агента и с отсутствием соединения B-1 или B2).

Средняя доля поражения: Нормализованные значения вычитают из 1,0. Тройные значения усредняют.

5 Активность по Блиссу: Объединенная реакция С обоих агентов с отдельным действием для каждой концентрации или дозы А (соединения B-1 или B-2) и В (стандарт или лечащий агент) равна $C=A+B(1-A)$, где А и В представляют среднюю долю поражения от 0 до 1.

10 Превышение над оценкой по Блиссу: Объединенную реакцию С вычитают из средней доли поражения для каждого сочетания. Это значение (С) умножают на 100 с получением оценки по Блиссу. Отдельные оценки по Блиссу больше 10 считаются сильно синергетическими, больше 5 считаются синергетическими, меньше -5 являются антагонистическими, и менее -10 считаются сильно антагонистическими. Значения между 5 и -5 считаются аддитивными.

15 15 Средняя по Блиссу: Для каждой матрицы сочетания среднюю оценку по Блиссу применяют для определения категории каждой опухоли и схемы лечения как синергетической, антагонистической или аддитивной, как описано выше.

20 Результаты для соединения B-2 в сочетании с доксорубицином: Для оценки синергии между доксорубицином и соединением B-2 применяют модель аддитивизма Блисса. Эта модель является статистическим способом, который количественно оценивает фракционную реакцию двух соединений, добавленных в сочетании. Результат будет аддитивным (таким же, как сумма двух соединений по отдельности), синергетическим (одно соединение усиливает эффект другого) или антагонистическим (одно соединение ингибирует действие другого). Среднюю оценку по Блиссу для каждой опухоли и схемы 25 лечения применяют для определения синергии, антагонизма или аддитивности следующим образом: больше 10 считается сильно синергетической, больше 5 считается синергетической, меньше -5 является антагонистической, и менее -10 считается сильно антагонистической. Значения между 5 и -5 считаются аддитивными.

25 Одиннадцать опухолей рака яичников оценивают на реакцию на сочетание доксорубицина и соединения B-2 (таблица 18). Все 11 опухолей (100%) показали синергию или аддитивность. Четыре опухоли показали сильную синергию (36%). В большинстве случаев синергия была ограничена только тем, что большинство клеток было убито только доксорубицином; синергия и сильная синергия наблюдается при субоптимальных концентрациях доксорубицина.

35 35 Две опухоли рака эндометрия оценивают на реакцию на сочетание доксорубицина и соединения B-2 (таблица 18). ENX005 показала сильную синергию, и ENX001 показала синергию.

Таблица 18. Итоги для сочетаний с соединением B-2 и Доксорубицином

Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
OVX001	Рак яичников	11	Сильно синергетическая
CTG-0992	Рак яичников	8	Синергетическая
CTG-1301	Рак яичников	8	Синергетическая
CTG-0947	Рак яичников	10	Синергетическая
CTG-0252	Рак яичников	14	Сильно синергетическая
CTG-0258	Рак яичников	9	Синергетическая
CTG-0791	Рак яичников	14	Сильно синергетическая
CTG-1423	Рак яичников	12	Сильно синергетическая
CTG-0253	Рак яичников	6	Синергетическая
CTG-0486	Рак яичников	5	Аддитивная

CTG-1166	Рак яичников	8	Синергетическая
ENX005	Рак эндометрия	21	Сильно синергетическая
ENX001	Рак эндометрия	6	Синергетическая

Результаты для соединения B-1 в сочетании с химиотерапевтическими агентами:

5 Девять опухолей НМКРЛ оценивают на реакцию на сочетание радиации и соединения B-1. Все 9 опухолей (100%) показали синергию или аддитивность (таблица 19). Три опухоли показали сильную синергию (33%) (таблица 19). Двадцать опухолей (НМКРЛ, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак пищевода) также оценивают на реакцию на сочетание блеомицина и соединения B-1. Все 20 показали синергию или аддитивность 10 (таблица 20). Шесть из них (30%) показали сильную синергию (таблица 20). Ткани происхождения опухоли не влияет на степень реакции на сочетание блеомицина и соединения B-1.

15 Одну опухоль печеночно-клеточной карциномы (ПКК) оценивают на реакцию на сочетание доксорубицина и соединения B-1. Эта опухоль демонстрирует аддитивную реакцию (таблица 21).

Четыре опухоли рака поджелудочной железы оценивают на реакцию на сочетание гемцитабина и соединения B-1. Из 4 опухолей, 2 (50%) показали аддитивность, и остальные 2 (50%) показали антагонизм (таблица 22).

20 Десять опухолей (НМКРЛ, рак пищевода, рак желудка) оценивают на реакцию на сочетание цисплатина и соединения B-1. Девять из 10 опухолей показали аддитивность или синергию (90%), и одна из них показала сильную синергию. Однако одна опухоль демонстрирует антагонизм (10%) (таблица 23).

25 Пять опухолей оценивают на реакцию на сочетание 5-ФУ (5-Фторурацила) и соединения B-1. Все 5 опухолей (100%) показали синергию или аддитивность (таблица 24).

Пять опухолей оценивают на реакцию на сочетание Карбоплатина и соединения B-1. Все 5 опухолей (100%) показали синергию или аддитивность (таблица 25).

30 Пять опухолей оценивают на реакцию на сочетание паклитаксела и соединения B-1. Четыре из 5 опухолей (80%) показали аддитивность, и оставшаяся опухоль (20%) показала антагонизм (таблица 26).

Четыре опухоли оценивают на реакцию на сочетание Этопозида и соединения B-1. Все 3 опухоли (100%) показали сильную синергию (таблица 27).

В общем, 29/68 (46%) схем комбинированного лечения с соединением B-1 демонстрируют синергию или сильную синергию в анализах АХО. Кроме того, 29/63 (46%) показали аддитивные эффекты. Только очень небольшая часть опухолей (4/63; 6%) показали антагонизм. Не наблюдалось смещения реакции в зависимости от ткани происхождения опухолей для любого комбинированного лечения. Радиация, блеомицин и этопозид, объединенные с соединением B-1, показали наибольшую и наиболее сообразную синергию среди типов опухолей. Сочетания с Доксорубицином, 45 карбоплатином и 5-ФУ показали первичные аддитивные реакции. Паклитаксел, цисплатин и гемцитабин также демонстрируют преобладающие аддитивные реакции, но показывают антагонизм а небольшой части тестированных опухолей.

Таблица 19. Итоги для сочетаний с соединением B-1 и радиацией

Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
YAS111611	Легкое (НМКРЛ)	1	Аддитивная
OD35982	Легкое (НМКРЛ)	5	Аддитивная
OD29498	Легкое (НМКРЛ)	2	Аддитивная
OD36088	Легкое (НМКРЛ)	14	Сильно синергетическая

TS110310	Легкое (НМКРЛ)	16	Сильно синергетическая
OD26131	Легкое (НМКРЛ)	12	Сильно синергетическая
OD33966	Легкое (НМКРЛ)	8	Синергетическая
OD33117	Легкое (НМКРЛ)	9	Синергетическая
OD26749	Легкое (НМКРЛ)	7	Синергетическая

5

Таблица 20. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и Блеомицином			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
OD33966	Легкое (НМКРЛ)	3	Аддитивная
TS110310	Легкое (НМКРЛ)	2	Аддитивная
OD25982	Легкое (НМКРЛ)	4	Аддитивная
OD29498	Легкое (НМКРЛ)	3	Аддитивная
P110325	Рак поджелудочной железы	0	Аддитивная
GAX027	Рак желудка	11	Сильно синергетическая
GAX001	Рак желудка	14	Сильно синергетическая
OD36088	Легкое (НМКРЛ)	14	Сильно синергетическая
OD26749	Легкое (НМКРЛ)	10	Сильно синергетическая
P110603	Рак поджелудочной железы	14	Сильно синергетическая
P110323	Рак поджелудочной железы	10	Сильно синергетическая
ESX005	Рак пищевода	6	Синергетическая
ESX008	Рак пищевода	7	Синергетическая
GAX007	Рак желудка	5	Синергетическая
YAS111611	Легкое (НМКРЛ)	6	Синергетическая
OD33117	Легкое (НМКРЛ)	9	Синергетическая
OD26131	Легкое (НМКРЛ)	9	Синергетическая
P110408	Рак поджелудочной железы	7	Синергетическая
P110504	Рак поджелудочной железы	8	Синергетическая
P110413	Рак поджелудочной железы	6	Синергетическая

25

Таблица 21. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и гидрохлоридом доксорубицина			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
L090923	Рак печени	4	Аддитивная

30

Таблица 22. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и Гемцитабином			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
P110603	Рак поджелудочной железы	-2	Аддитивная
P110413	Рак поджелудочной железы	-1	Аддитивная
P110325	Рак поджелудочной железы	-9	Антагонистическая
P110504	Рак поджелудочной железы	-6	Антагонистическая

35

Таблица 23. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и Цисплатином			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
ESX005	Рак пищевода	2	Аддитивная
ESX008	Рак пищевода	1	Аддитивная
GAX007	Рак желудка	2	Аддитивная
GAX027	Рак желудка	-3	Аддитивная
OD33966	Легкое (НМКРЛ)	-1	Аддитивная
TS110310	Легкое (НМКРЛ)	-3	Аддитивная
YAS111611	Легкое (НМКРЛ)	-6	Антагонистическая
GAX001	Рак желудка	14	Сильно синергетическая
OD36088	Легкое (НМКРЛ)	6	Синергетическая
OD33117	Легкое (НМКРЛ)	6	Синергетическая

40

Таблица 24. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и 5-ФУ			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
ESX005	Рак пищевода	-1	Аддитивная
ESX008	Рак пищевода	-2	Аддитивная

45

GAX007	Рак желудка	0	Аддитивная
GAX027	Рак желудка	4	Аддитивная
GAX001	Рак желудка	6	Синергетическая

Таблица 25. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и Карбоплатина			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
ESX005	Рак пищевода	3	Аддитивная
GAX007	Рак желудка	4	Аддитивная
GAX027	Рак желудка	4	Аддитивная
GAX001	Рак желудка	2	Аддитивная
ESX008	Рак пищевода	5	Синергетическая

Таблица 26. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и Паклитакселом			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
ESX005	Рак пищевода	-3	Аддитивная
GAX007	Рак желудка	-4	Аддитивная
GAX027	Рак желудка	1	Аддитивная
GAX001	Рак желудка	-1	Аддитивная
ESX008	Рак пищевода	-5	Антагонистическая

Таблица 27. Итоги для сочетаний с соединением В-1 и Этопозидом			
Идентификатор опухоли	Тип опухоли	Средняя оценка по Блиссу	Синергия/аддитивность/антагонизм
OD29498	Легкое (НМКРЛ)	13	Сильно синергетическая
OD26749	Легкое (НМКРЛ)	19	Сильно синергетическая
LUX031	Легкое (МКРЛ)	16	Сильно синергетическая
LUX013	Легкое (МКРЛ)	15	Сильно синергетическая

Пример 9: pH2AX и pKAP1 в качестве биомаркеров для ингибирования ДНК-ПК

Ионизирующее облучение (ИО) вызывает множественные повреждения ДНК, из которых двухцепочечные разрывы (ДЦР) являются наиболее цитотоксичными. См., например, Salles B. DNA-PK, a pharmacological target in cancer chemotherapy and radiotherapy? J Cancer Sci Ther 2011; S8:1-11. Эти ДЦР могут приводить к смерти клетки через апоптоз и/или митотическую катастрофу, если их не восстановить быстро и полностью. Кроме ИО, определенные химиотерапевтические агенты, включая антрациклины (доксорубицин), ингибиторы топоизомеразы II и блеомицин, также вызывают ДЦР. См., например, Helleday T. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2008; 8:193-204. Такие повреждения ДНК запускают комплекс сигналов через сеть реакций на повреждение ДНК, который функционирует на восстановление поврежденной ДНК и сохранение жизнеспособности клетки и геномной стабильности.

В клетках млекопитающих преимущественным путем восстановления ДЦР является путь негомологичного соединения концов (НСК). См., например, Bolderson E, et al. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. Clin Cancer Res 2009; 15(20):6314-6320. Этот путь функционирует независимо от фазы клеточного цикла и не требует шаблона для ре-лигирования разорванных концов ДНК. НСК требует координации многих белков и сигнальных путей. Основной аппарат НСК состоит из Ku70/80 гетеродимера и каталитической подъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПКкп), которые вместе содержат активный комплекс ДНК-ПК фермента. ДНК-ПКкп является членом фосфатидилинозит 3-киназы-родственной киназы (ФИКК) семейства серин/треонин протеинкиназ, которые также включают мутантную при атаксии-телеangiэктиазии киназу (ATM), родственную атаксии-телеangiэктиазии и Rad3 киназу (ATR) и мишень рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR). Однако, хотя ДНК-ПКкп находится в том же семействе протеинкиназ, как и ATM и ATR, эти последние киназы действуют на восстановление повреждения ДНК

через путь гомологической рекомбинации (ГР) и ограничены S и G₂ фазами клеточного цикла. Дополнительно, хотя ATM также привлекается в места ДЦР, ATR привлекается в места одноцепочечных разрывов ДНК. См., например, Dobbs, TA, et al. A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. DNA Repair 2010; 9:1307-1314.

Считают, что НСК проходит через три ключевые стадии: распознавание ДЦР, обработка ДНК для удаления не лигатирующими концов или других форм повреждения на концах и конечное лигирование концов ДНК. Распознавание ДЦР проводят связыванием Ku гетеродимера с разорванными концами ДНК с последующим привлечением двух молекул ДНК-ПКкп в соседние стороны ДЦР; это служит для защиты разорванных концов до привлечения дополнительных обрабатывающих ферментов. Недавние данные подтверждают гипотезу, что ДНК-ПКкп фосфорилирует обрабатывающий фермент, Artemis, а также саму себя для получения ДНК концов для дополнительной обработки. См., например, Bolderson and Dobbs, *supra*. В некоторых случаях ДНК полимераза может потребоваться для синтеза новых концов до стадии лигирования. Полагают, что аутофосфорилирование ДНК-ПКкп вызывает конформационное изменение, которое открывает центральную связывающую полость ДНК, выделение ДНК-ПКкп из ДНК и способствует полному религированию концов ДНК.

Кроме ДНК-ПК, ATM также активируется и привлекается в места ДЦР, фосфорилируя множество субстратов, включая гистон H2A вариант X (H2AX) на остатке Ser139 (pH2AX или гамма H2AX) (см., например, Stiff, T. et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. Cancer Res 2004; 64: 2390-2396), а также KAP1 на остатке Ser824 (pKAP1) (см., например, White DE et al. KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. Cancer Res 2006; 66:11594-11599). Таким образом, уровни pH2AX и pKAP1 могут служить индикаторами ДЦР и восстановления ДНК. Целью этого исследования является оценка pH2AX и pKAP1 в качестве биомаркеров для ингибирования ДНК-ПК в культивированных раковых клетках, обработанных стандартными химиотерапевтическими ДНК повреждающими агентами этопозидом или доксорубицином, отдельно или в сочетании с селективным ингибитором ДНК-ПК соединением B-1 и соединением B-2.

Материалы и способы. Колонии раковых клеток человека A549 (CCL-185), DU4475 (HTB-123), MDA-MB-436 (HTB-130) и MDA-MB-468 (HTB-132) получают из Американской коллекции типовых культур (ATCC; Manassas, VA). 10 мМ исходные растворы соединения B-1 или соединения B-2 готовят в ДМСО и хранят при -20°C. Этопозид и доксорубицин покупают у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Колонию клеток рака легкого человека A549 покупают у ATCC и культивируют в DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1× не незаменимых аминокислот и 1× пенициллина/стрептомицина (цельная среда). Клетки выдерживают в субконфлюентном состоянии пассированием каждые 2-3 дня. Колонии клеток рака молочной железы человека DU4475, MDA-MB-436 и MDA-MB-468 покупают у ATCC и культивируют в DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1× Glutamax и 1× пенициллина/стрептомицина. Клетки выдерживают в субконфлюентном состоянии пассированием каждые 2-3 дня.

Соединение B-1 и соединение B-2 готовят в виде 10 мМ исходных растворов в ДМСО и хранят при -20°C; Этопозид готовят в виде 20 мМ исходного раствора в ДМСО и хранят при -20°C. Соединение B-1 и соединение B-2, применяемые в этих экспериментах,

готовят не в виде сокристаллов.

Клетки рака легкого A549, выращенные в 12-луночных (Costar 3513) планшетах для культивирования тканей до 70-80% конфлюэнтности, прединкубируют с указанными концентрациями соединения B-1 или ДМСО в течение 45 мин. Этапозид добавляют до 5 конечной концентрации 10 мкМ из 4× рабочего исходного раствора, приготовленного в культуральной среде. Затем клетки инкубируют в течение указанного количества времени и собирают для анализа.

Колонии клеток рака молочной железы, выращенные в 24-луночных (Costar, каталожный №3526) или 6-луночных (Costar, каталожный №3516) планшетах для 10 культивирования тканей до 70-80% конфлюэнтности, прединкубируют с 1 мкМ соединения B-2 или ДМСО в течение 15 мин. Доксорубицин добавляют до конечной концентрации либо 100 нМ, либо 500 нМ из 1000× рабочего исходного раствора, приготовленного в ДМСО. Затем клетки инкубируют в течение указанного количества времени и собирают для анализа.

15 Для экспериментов с отмыванием, доксорубицин и среду, содержащую соединение B-2, удаляют в указанное время, и клетки промывают один раз 1× ФРФБ, и добавляют свежую среду, содержащую 1мкМ соединения B-2. Клетки инкубируют в течение 8 ч после исходного добавления доксорубицина и затем собирают для анализа.

Клеточный лизис и вестерн-блоттинг. Клетки, обработанные соединением B-1 или 20 соединением B-2 в сочетании с химиотерапевтическими агентами, промывают один раз ледяным ФРФБ и затем растворяют в 150 мкл/лунку 2× SDS-PAGE буфере для образца, переносят в микроцентрифужные пробирки и нагревают в 105°C нагревательном блоке в течение 5 мин для иммуноблоттинга. 15-мкл аликовту каждого SDS-PAGE образца загружают в 12-трековые 4 20% Tris-Glycine гели, и гели прогоняют при постоянном 25 напряжении 125 В до тех пор, пока передняя линия красителя не достигнет дна (приблизительно 2 ч). После электрофореза, разделенные елки в гелях переносят на нитроцеллюлозную мембрану. Перенос осуществляют в течение 2 ч при постоянном токе 1,5 А в холодной комнате с применением аппарата для переноса Hoefer (модель TE42 или TE62, Hoefer Inc, Holliston, MA) согласно инструкциям производителя. После 30 переноса нитроцеллюлозные мембранны инкубируют с блокирующим буфером в течение 1 ч при комнатной температуре. Нитроцеллюлозные мембранны разрезают, и нижние половины инкубируют в течение ночи с 2 первичными антителами, анти-pH2AX (1/1000) и анти-тотальное H2AX (1/1000). После промывания меченные подходящей 35 флуоресценцией вторичные антитела добавляют к мембранам и затем визуализируют с pH2AX на 800 (зеленом) канале и тотальным H2AX на 700 (красном) канале. Верхние половины мембран исследуют последовательно на pKAP1 (1/1000) на 700 (красном) канале, и затем исследуют на тотальный KAP1 (1/1000) и GAPDH (1/2500) на 800 (зеленом) канале. Получение изображений проводят с применением флуоресцентной системы получения изображений Odyssey (Li-Cor Biosciences; Lincoln, NE).

40 Сочетание соединения B-1 и Этапозида в клетках легкого A549. Для исследования действия ингибирования ДНК-ПК на pKAP1 *in vitro*, клетки A549 прединкубируют с 3 мкМ соединения B-1 в течение 45 мин и затем добавляют этапозид до конечной концентрации 10 мкМ. Клетки собирают в разные моменты времени после добавления этапозида и анализируют уровни pH2AX и pKAP1 иммуноблоттингом. Результаты

45 показаны на фиг. 20A-20B. Обработка Этапозидом дает постепенное повышение уровней pH2AX и pKAP1 в течение 2 часов, что указывает на повреждение ДНК. Уровни этих маркеров затем постепенно снижаются в течение следующих 6 ч, вероятно отражая восстановление повреждения ДНК приспособлениями для восстановления повреждения

ДНК. Совместная обработка клеток соединением B-1 и этопозидом дает улучшение уровней pH2AX (макс. 2-кратно за 8 ч) и pKAP1 (макс. 7-кратно за 8 ч) по сравнению с обработкой только этопозидом, что согласуется с гипотезой, что ингибирование ДНК-ПК облегчает восстановление повреждения ДНК, вызванное этопозидом.

5 Сочетание соединения B-2 и доксорубицина в колонии клеток рака молочной железы в культуре. Для исследования действия ингибирования ДНК-ПК на pKAP1 и pH2AX *in vitro*, клетки рака молочной железы DU4475 прединкубируют с 1 мкМ соединения B-2 в течение 15 мин, затем добавляют 100 нМ или 500 нМ доксорубицина. Клетки собирают в различные моменты времени после добавления доксорубицина и анализируют уровни 10 pKAP1 и pH2AX иммуноблоттингом. Результаты показаны на фиг. 21A-21B. Обработка доксорубицином дает повышенные уровни pKAP1 и pH2AX от 4-8 ч, которые продолжают повышаться вплоть до 24 ч в группе 500 нМ, но не в группе 100 нМ. Одновременная обработка 100 нМ или 500 нМ доксорубицина и соединения B-2 дает улучшенные уровни pKAP1 (макс. 37-42-кратные за 12-24 ч и 19-кратные за 8 ч для 100 15 нМ и 500 нМ доксорубицина, соответственно) и pH2AX (макс. 2-кратные за 12 ч и 1,6-кратные за 12 ч для 100 нМ и 500 нМ доксорубицина, соответственно), что согласуется с замечанием, что ингибирование ДНК-ПК облегчает восстановление повреждения ДНК, вызванное доксорубицином.

Для определения того, что улучшение повреждения ДНК совместной обработкой 20 клеток соединением B-2 и доксорубицином не является специфическим для клеток DU4475, две дополнительные колонии клеток рака молочной железы, MDA-MB-436 и MDA-MB-468, также прединкубируют с 1 мкМ соединения B-2 в течение 15 мин, затем добавляют 500 нМ доксорубицина. Клетки собирают в различные моменты времени после добавления доксорубицина и анализируют уровни pKAP1 и pH2AX 25 иммуноблоттингом. См. фиг. 22A-22B. Обработка Доксорубицином снова вызывает повышение уровня pKAP1 и pH2AX за 4 ч, которые остаются повышенными даже в течение 8 ч. Одновременная обработка соединением B-2 вызывает улучшение уровней pKAP1 (макс. 3,5-4-кратное за 8 ч) и pH2AX (макс. 1,5-кратное за 8 ч), что согласуется с результатами для колонии клеток DU4475, показывая, что такая комбинированная 30 обработка эффективна во множестве колоний клеток рака молочной железы.

Для определения действия импульса доксорубицина в сочетании с ингибитором 35 ДНК-ПК на уровни pKAP1 и pH2AX, которое наиболее близко имитирует *in vivo* введение доксорубицина, клетки рака молочной железы MDA-MB-468 прединкубируют с 1 мкМ соединения B-2 в течение 15 мин, затем добавляют 500 нМ доксорубицина. В указанные моменты времени среду удаляют из клеток и добавляют свежую среду, 40 содержащую только 1 мкМ соединения B-2. Клетки собирают через 8 ч после изначального воздействия доксорубицина и анализируют уровни pKAP1 и pH2AX иммуноблоттингом. Результаты показаны на фиг. 23A-23C. Воздействие доксорубицина в течение 1-2 ч достаточно для определения pKAP1 и pH2AX, которые продолжают повышаться до 8 часов. Одновременная обработка с соединением B-2 дает улучшенные 45 уровни pKAP1 и pH2AX, начиная с 1 ч воздействия доксорубицина, что согласуется с гипотезой, что даже кратковременное воздействие доксорубицина достаточно для повреждения ДНК, которое может быть улучшено одновременной обработкой соединением B-2.

Заключение. pH2AX и pKAP1 оценивали в качестве маркеров повреждения ДНК в раковых клетках, обработанных стандартными ДНК-повреждающими химиотерапевтическими агентами отдельно и в сочетании с селективными ингибиторами ДНК-ПК соединением B-1 или соединением B-2. Конкретно, эти маркеры оценивают

на одной колонии клеток рака легкого (A549), обработанной этопозидом, и на 3 колониях клеток рака молочной железы, обработанных доксорубицином. В обоих типах раковых клеток, обработка только химиотерапевтическим агентом вызывает повышенные уровни pH2AX и pKAP1, что согласуется с известным механизмом действия

- 5 этих агентов, вызывающих двухцепочечные разрывы ДНК. Совместная обработка клеток этими химиотерапевтическими агентами в сочетании с селективным ингибитором ДНК-ПК соединением B-1 или соединением B-2 всегда повышает уровни pH2AX и pKAP1 по сравнению с только химиотерапевтическим агентом. Эти открытия согласуются с гипотезой, что ингибирование ДНК-ПК приводит к улучшению 10 повреждения ДНК, и что pKAP1 и pH2AX могут служить маркерами повреждения ДНК и ингибирования ДНК-ПК.

Пример 10: анализ биомаркера *in vivo*

- DOXIL® или носитель вводят в дозе 15 мг/кг голым мышам, имеющим ксенотрансплантаты опухоли H460. Опухоли собирают (N=3 на группу) от 15 минут 15 до 72 часов после введения DOXIL® и быстро замораживают в жидком азоте. Замороженные образцы подвергают вестерн-блоттингу с применением антитела против pKAP1. Уровни pKAP1 в опухолях H460 повышаются в 24 и 48 часов после обработки DOXIL® по сравнению с контрольным носителем.

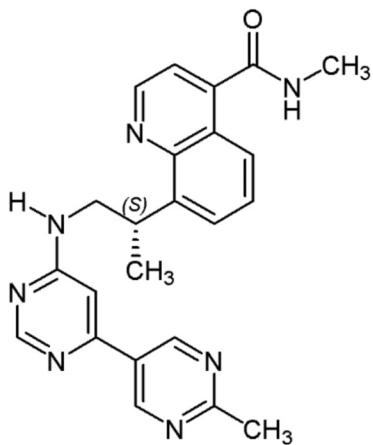
Другие варианты

- 20 Все представленные здесь ссылки включены сюда полностью в качестве ссылок. В данном описании все аббревиатуры, символы и условные обозначения соответствуют тем, которые применяют в современной научной литературе.

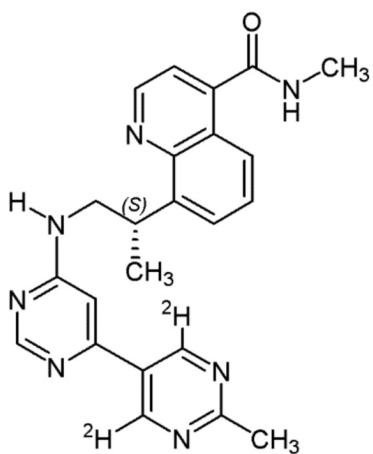
Хотя представленное выше описано более подробно с помощью иллюстраций и примеров с целью ясности понимания, специалисту в данной области техники будет 25 легко понять, в свете идей этого описания, что определенные изменения и модификации могут быть сделаны, не выходя за суть или объем представленной формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения пролиферативного расстройства у субъекта, где способ включает: 30 введение субъекту, нуждающемуся в таковом, ДНК-поражающего агента, и введение субъекту ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) в течение от 8 до 48 часов после введения ДНК-поражающего агента, где ДНК-поражающим агентом является доксорубициновый агент; 35 где пролиферативное расстройство представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака прямой и ободочной кишки, рака молочной железы, печеночно-клеточной карциномы, рака эндометрия и рака яичников, где ингибитором ДНК-ПК является соединение, выбранное из



соединения B-1 или



соединения B-2,

или его фармацевтически приемлемая соль, или

25

сокристалл, содержащий соединение B-1 или его фармацевтически приемлемую соль или соединение B-2 или его фармацевтически приемлемую соль и образователь сокристалла, выбранный из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты и бензойной кислоты.

30

2. Способ по пункту 1, где доксорубициновый агент находится в липосоме.

3. Способ по пункту 2, где липосомы пэгилированы.

4. Способ по пункту 2, где липосомы не пэгилированы.

5. Способ по любому из пунктов 1-4, где доксорубициновым агентом является гидрохлорид доксорубицина.

35

6. Способ по пункту 1, где ДНК-поражающим агентом является пэгилированный липосомальный доксорубицин.

7. Способ по пункту 6, где пэгилированный липосомальный доксорубицин вводят в дозе от 14 мг/м² до 80 мг/м², включительно.

8. Способ по пункту 7, где пэгилированный липосомальный доксорубицин вводят

40

в дозе от 18 мг/м² до 72 мг/м², включительно.

9. Способ по пункту 8, где пэгилированный липосомальный доксорубицин вводят в дозе от 25 мг/м² до 55 мг/м², включительно.

10. Способ по пункту 9, где пэгилированный липосомальный доксорубицин вводят

45

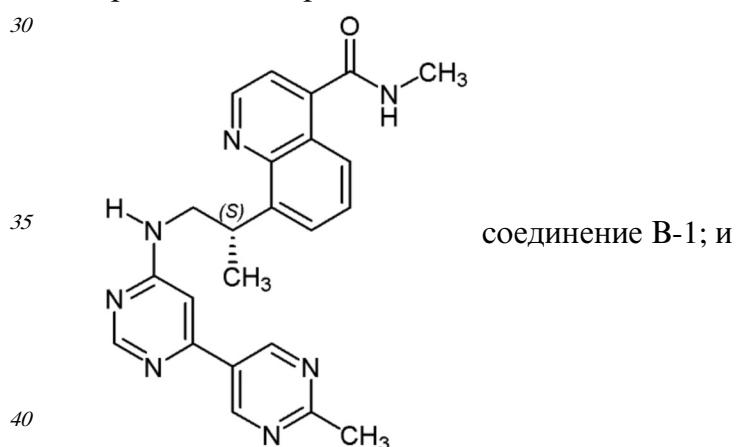
в дозе от 30 мг/м² до 50 мг/м², включительно.

11. Способ по пункту 10, где пэгилированный липосомальный доксорубицин вводят в дозе 40 мг/м² или 50 мг/м², включительно.

12. Способ по любому из пунктов 1-11, где ингибитор ДНК-ПК и ДНК-поражающий

агент вводят более одного цикла, где каждый цикл проводят с интервалом от 7 до 28 дней, и где цикл включает введение ДНК-поражающего агента один раз в День 1, и введение ингибитора ДНК-ПК от одного вплоть до 5 раз подряд, где каждое последующее время имеет интервал от 16 до 32 часов.

- 5 13. Способ по пункту 12, где каждый цикл проводят с интервалом 28 дней.
- 14. Способ по пункту 12, где ингибитор ДНК-ПК и ДНК-поражающий агент вводят, по крайней мере, в течение 2 циклов, и где каждый цикл проводят с интервалом 28 дней.
- 15 15. Способ по пункту 12, где ингибитор ДНК-ПК вводят в количестве 3, 4 или 5 раз подряд в цикле, где каждое последующее время имеет интервал 24 часов.
- 10 16. Способ по пункту 1, где указанный рак выбирают из группы, включающей рак яичников и рак эндометрия.
- 17. Способ по любому из пунктов 1-16, где ДНК-ПК ингибитор вводят в течение от 8 до 30 часов после введения ДНК-поражающего агента.
- 18. Способ по любому из пунктов 1-16, где ДНК-ПК ингибитор вводят в течение от 15 12 до 30 часов после введения ДНК-поражающего агента.
- 19. Способ по любому из пунктов 1-16, где ДНК-ПК ингибитор вводят в течение от 20 до 28 часов после введения ДНК-поражающего агента.
- 20 20. Способ по любому из пунктов 1-16, где ДНК-ПК ингибитор вводят в течение 16 часов после введения ДНК-поражающего агента.
- 21. Способ по любому из пунктов 1-16, где ДНК-ПК ингибитор вводят в течение 24 часов после введения ДНК-поражающего агента.
- 22. Способ по пункту 21, где способ включает введение ингибитора ДНК-ПК и ДНК-поражающего агента в течение, по крайней мере, 2 циклов, и где интервал между циклами составляет 28 дней, и где ДНК-поражающий агент вводят в День 1 и ингибитор ДНК-ПК вводят в Дни 2, 3 и 4 в цикле.
- 23. Способ по пункту 22, где способ включает введение ингибитора ДНК-ПК и ДНК-поражающего агента в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 циклов.
- 24. Способ по любому из пунктов 1-23, где ингибитором ДНК-ПК является сокристалл, содержащий соединение В-1 или его фармацевтически приемлемую соль:

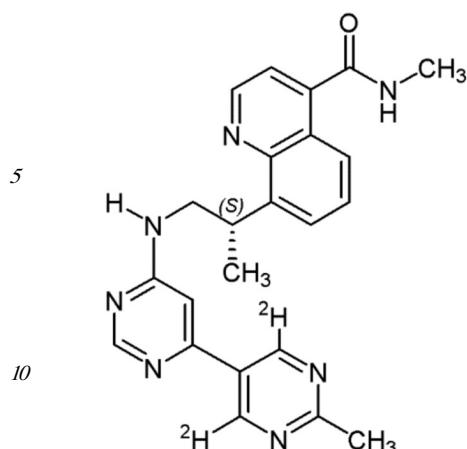


образователь сокристалла, выбранный из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты и бензойной кислоты.

25. Способ по пункту 24, где образователем сокристалла является адипиновая кислота.

26. Способ по пункту 25, где молярное отношение адипиновой кислоты к соединению В-1 составляет 1 к 2.

27. Способ по любому из пунктов 1-23, где ингибитором ДНК-ПК является сокристалл, содержащий соединение В-2 или его фармацевтически приемлемую соль:



соединение B-2; и

образователь сокристалла, выбранный из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты и бензойной кислоты.

15 28. Способ по пункту 27, где образователем сокристалла является адипиновая кислота.

29. Способ по пункту 28, где сокристалл содержит соединение B-2 и адипиновую кислоту в молярном отношении 1 к 2 адипиновой кислоты к соединению B-2.

30. Способ по пункту 29, где сокристалл вводят в количестве от 50 мг до 200 мг в сутки, включительно.

20 31. Способ по пункту 29, где сокристалл вводят в количестве от 50 мг до 2000 мг в сутки, включительно.

32. Способ по пункту 31, где сокристалл вводят в количестве от 100 мг до 1500 мг в сутки, включительно.

25 33. Способ по пункту 1, где ингибитор ДНК-ПК вводят один, два или три раза в сутки.

30

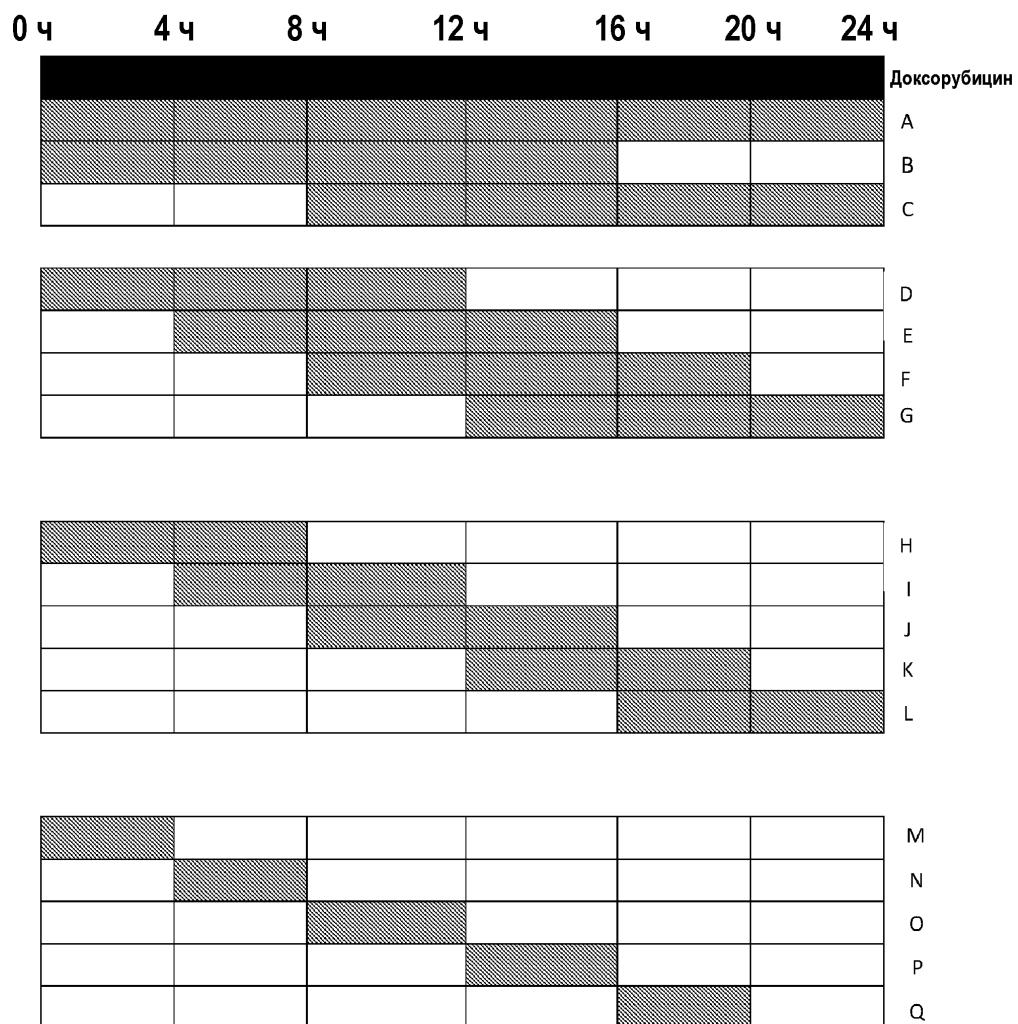
35

40

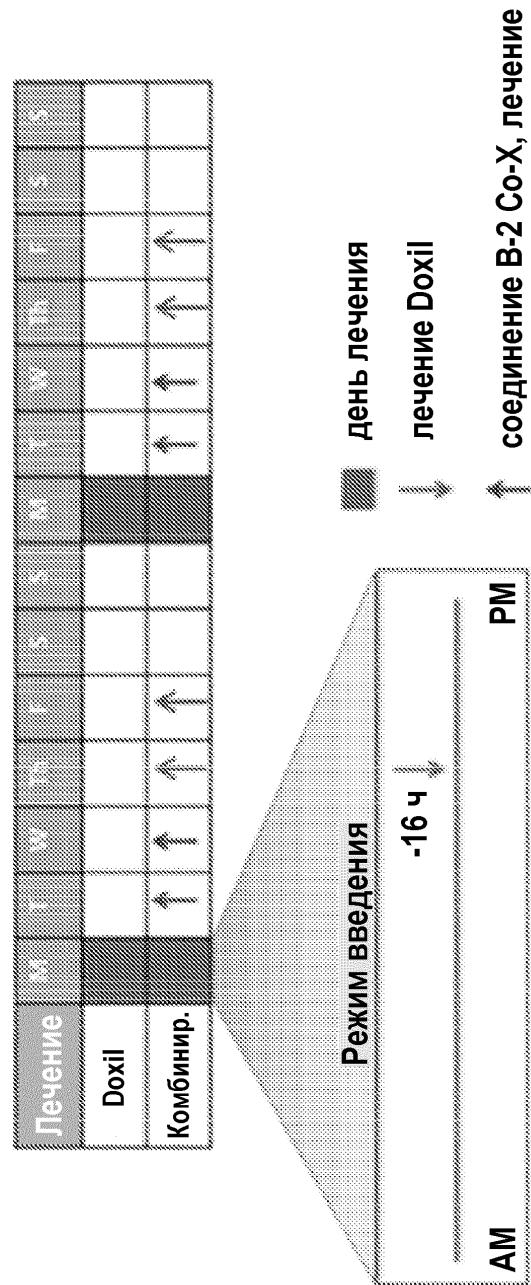
45

1/32

ФИГ.1



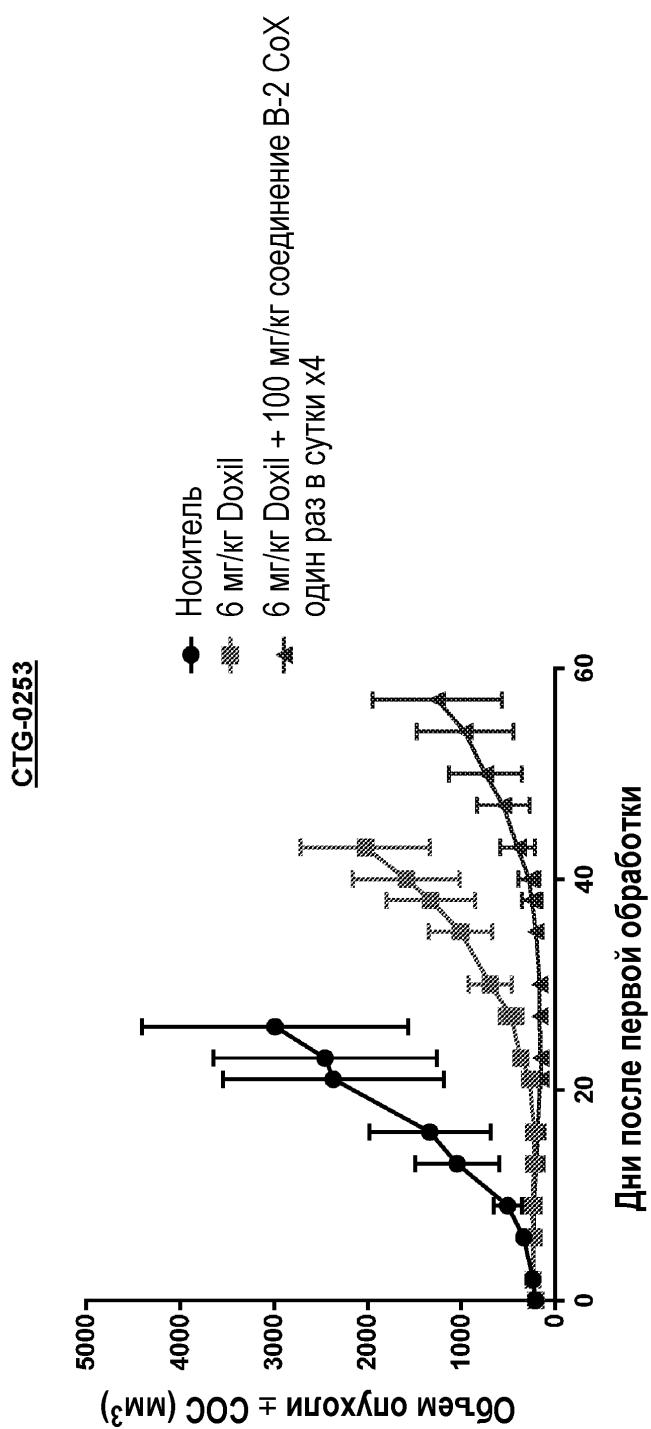
2/32



ФИГ.2

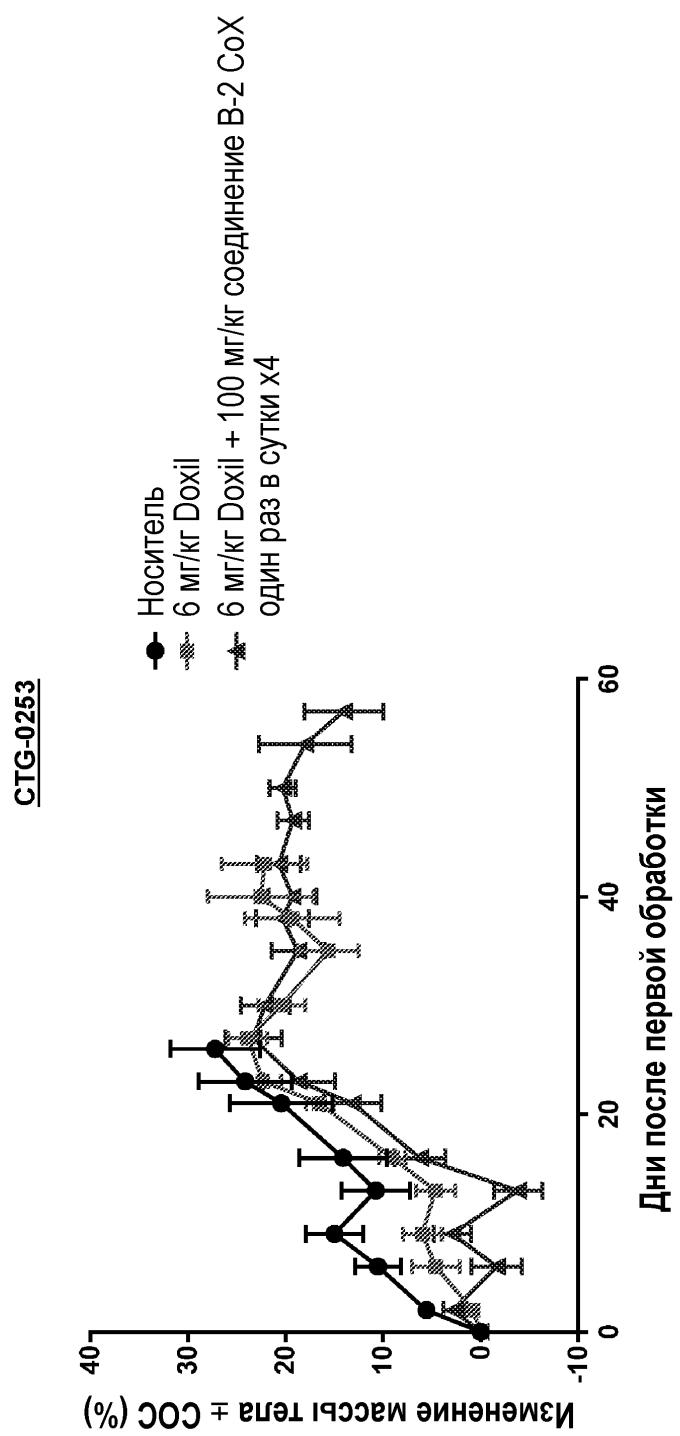
3/32

ФИГ.3

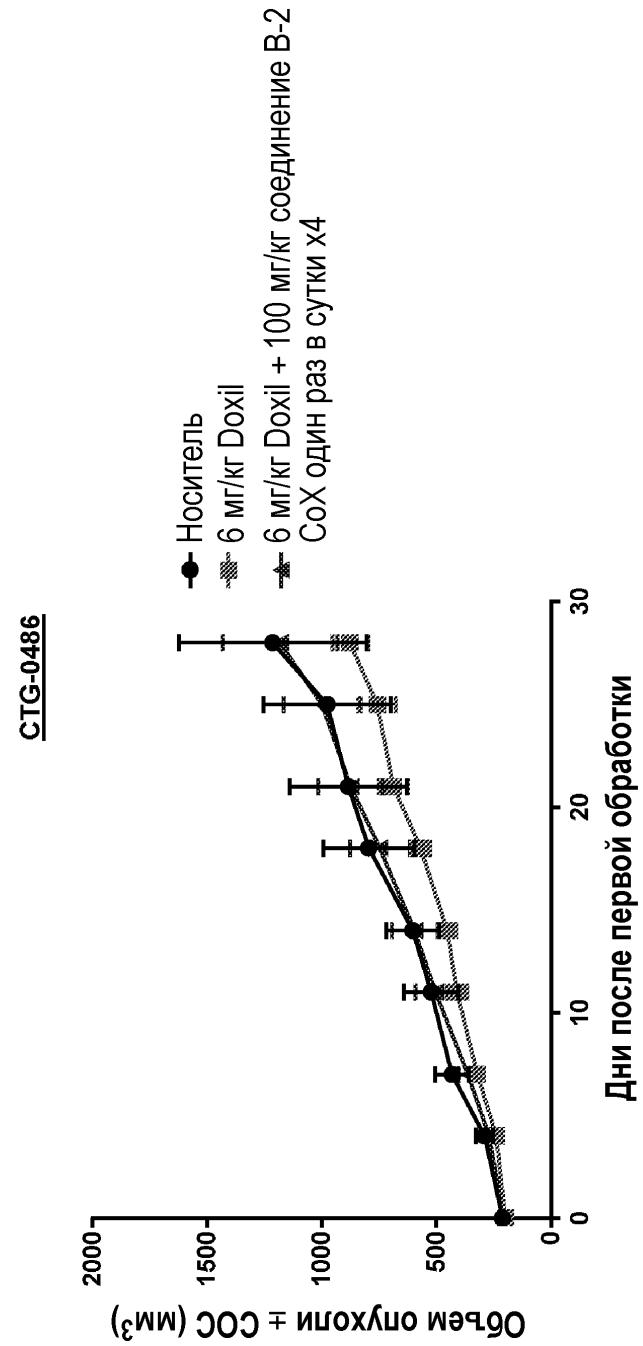


4/32

ФИГ.4



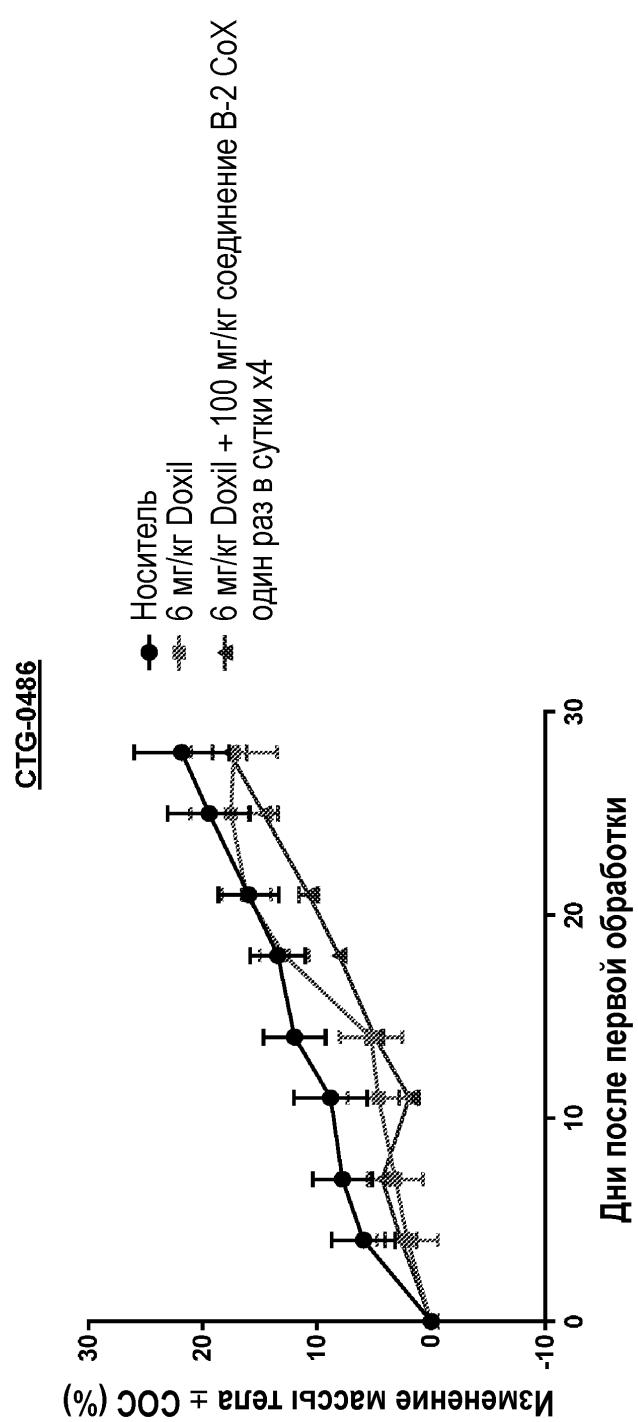
5/32



ФИГ.5

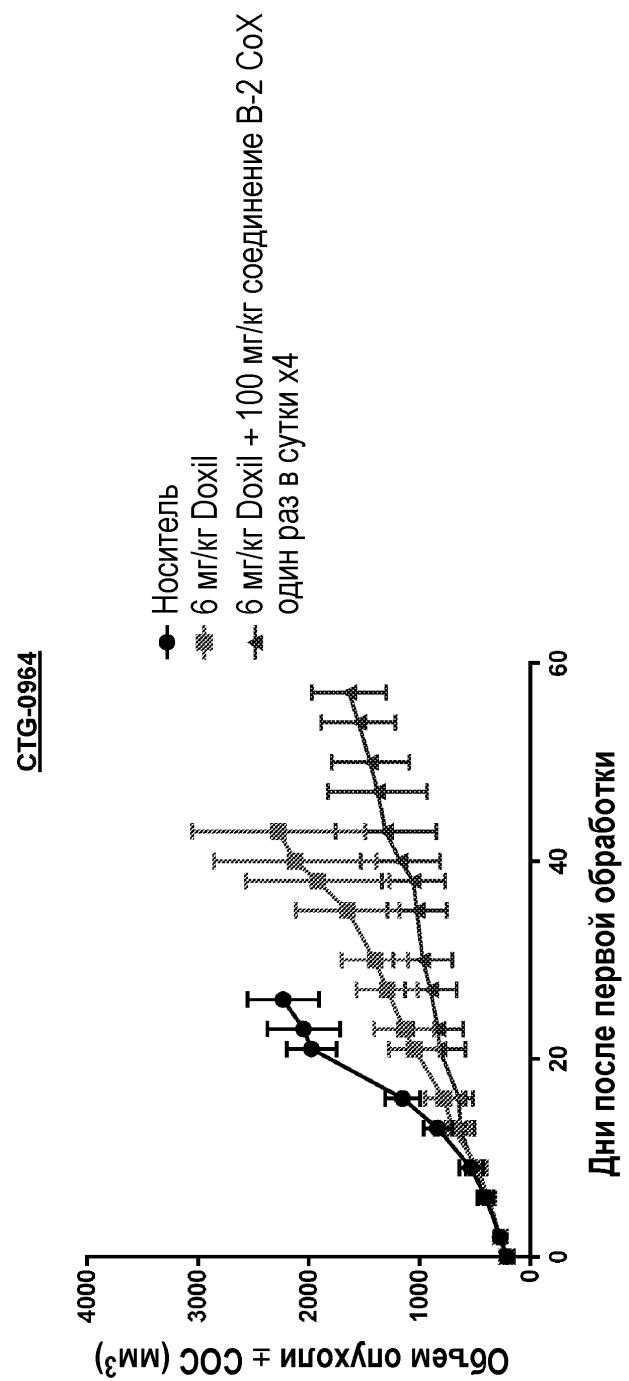
6/32

ФИГ. 6



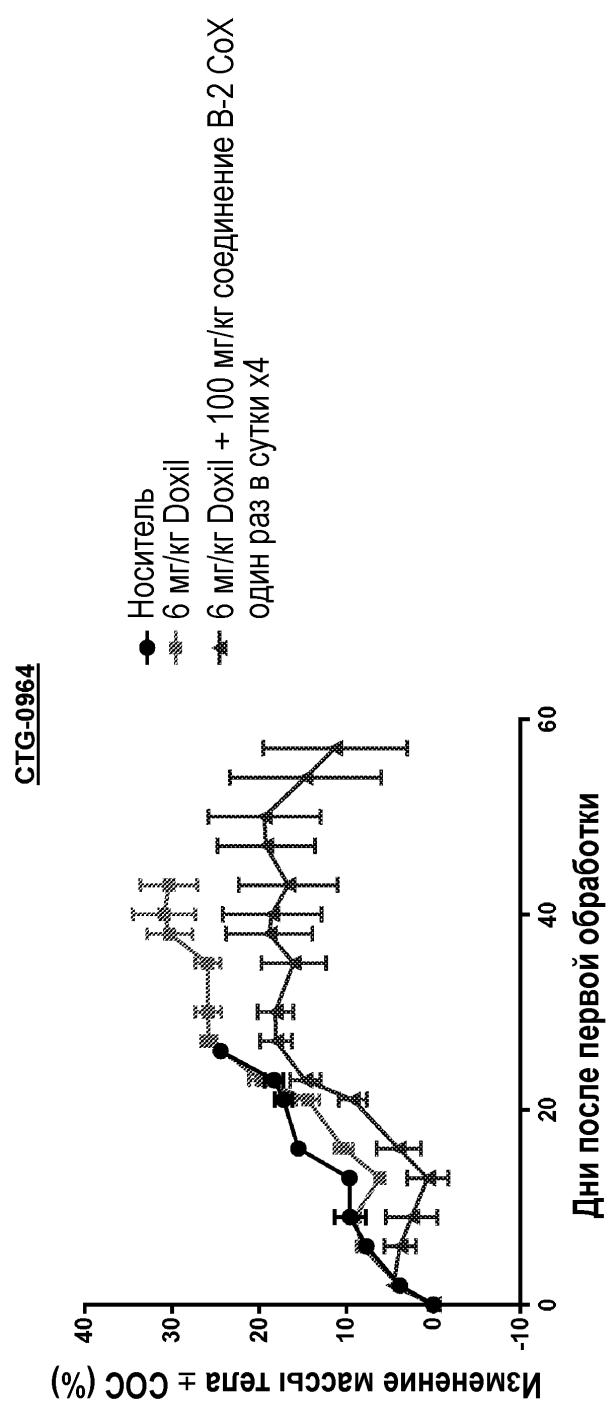
7/32

ФИГ.7



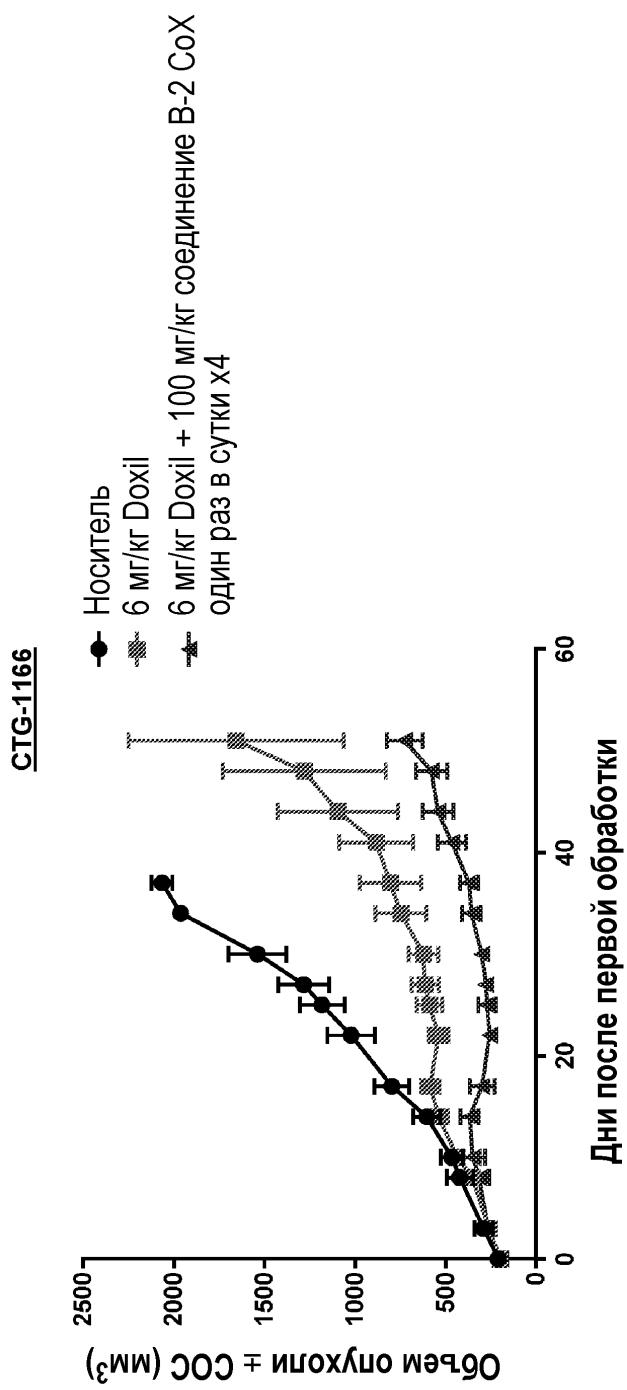
8/32

ФИГ.8

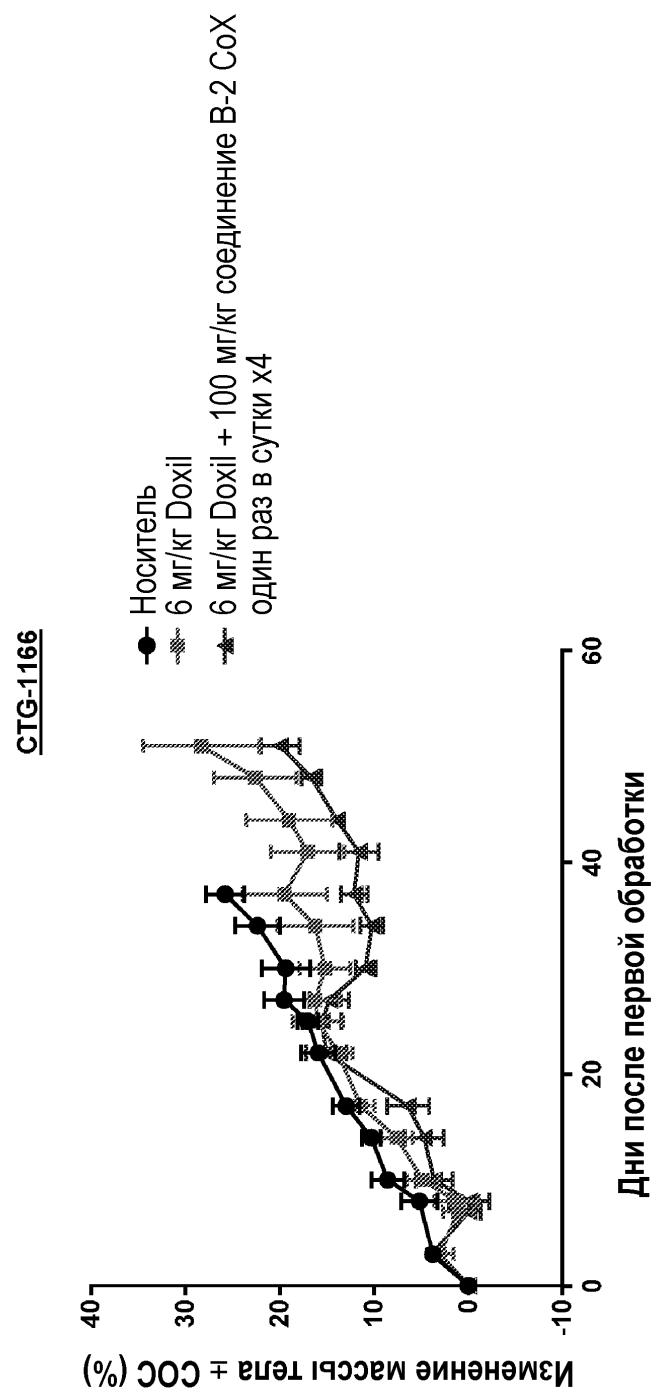


9/32

ФИГ.9



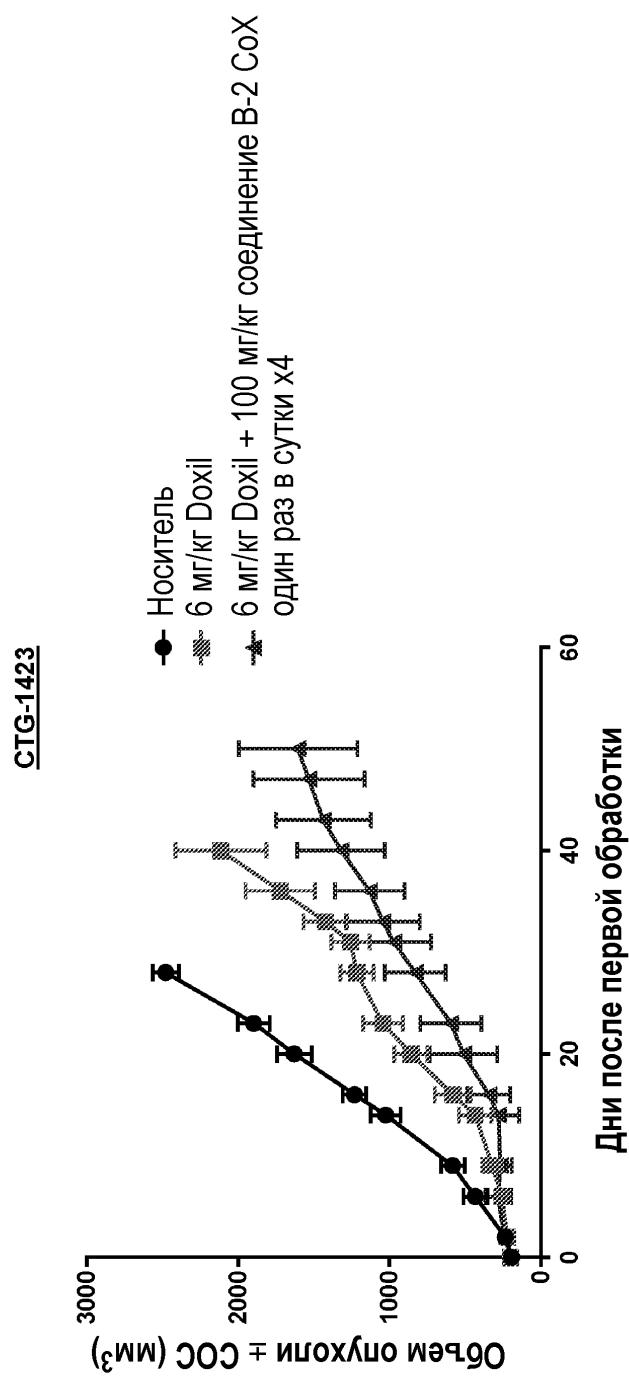
10/32



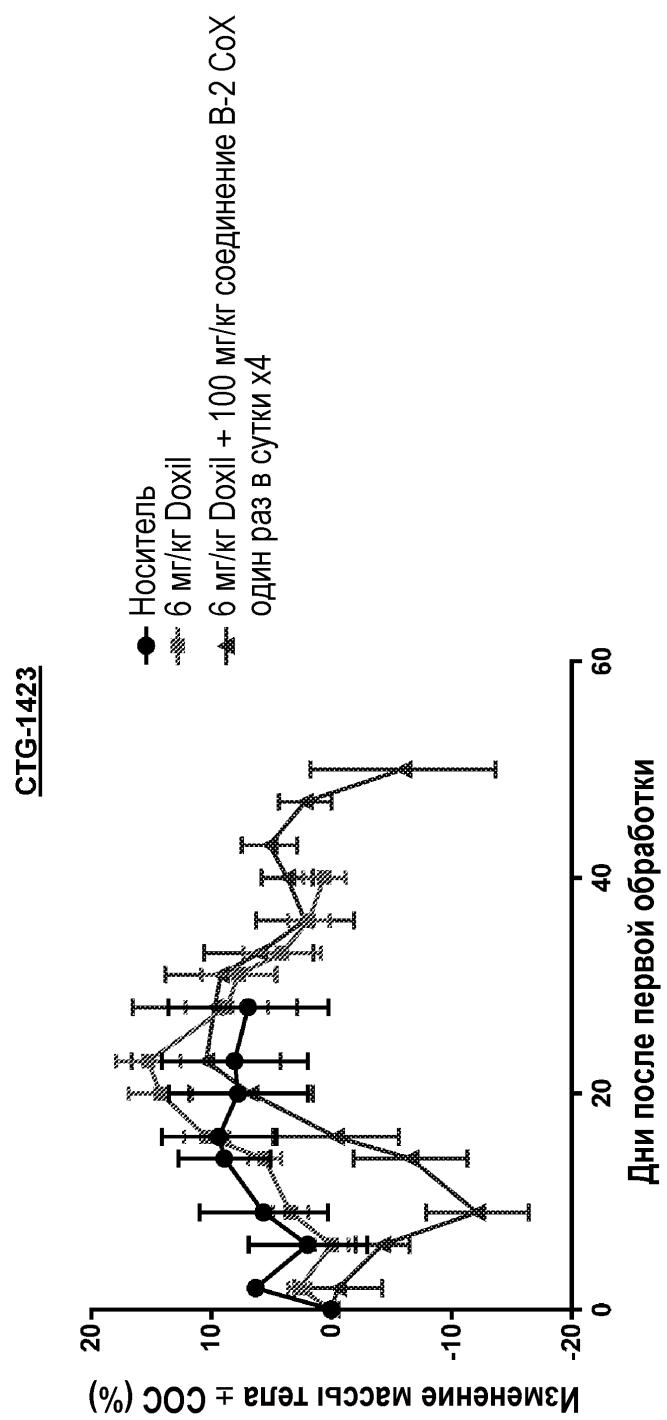
ФИГ.10

11/32

ФИГ. 11



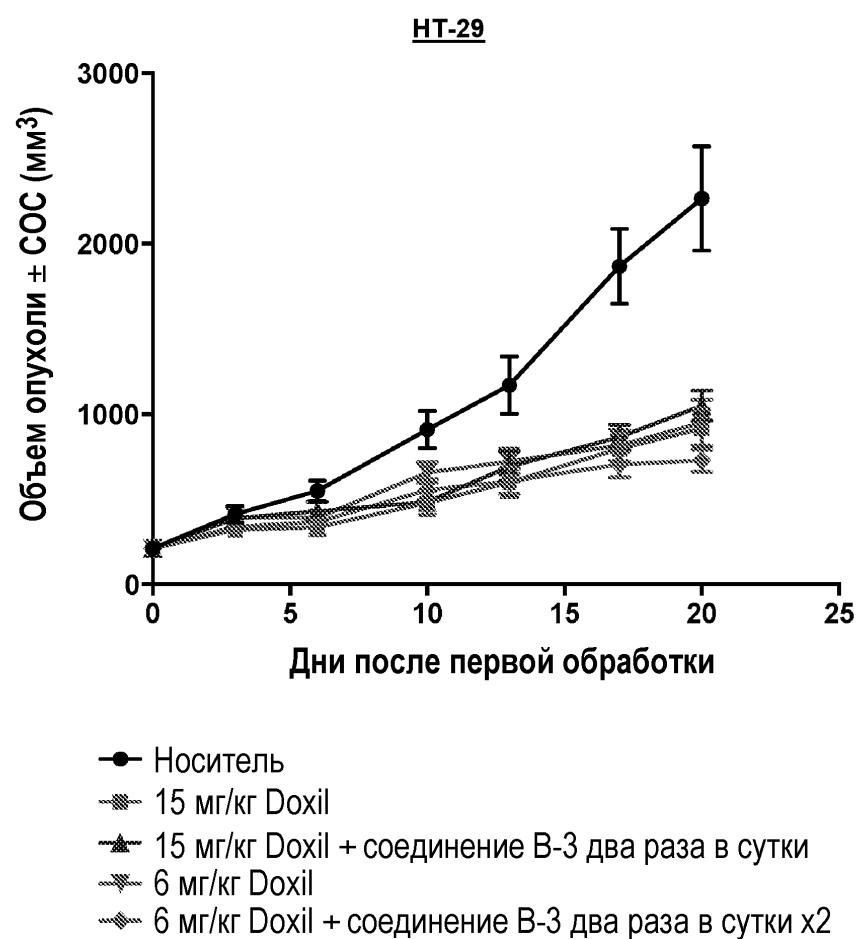
12/32



ФИГ.12

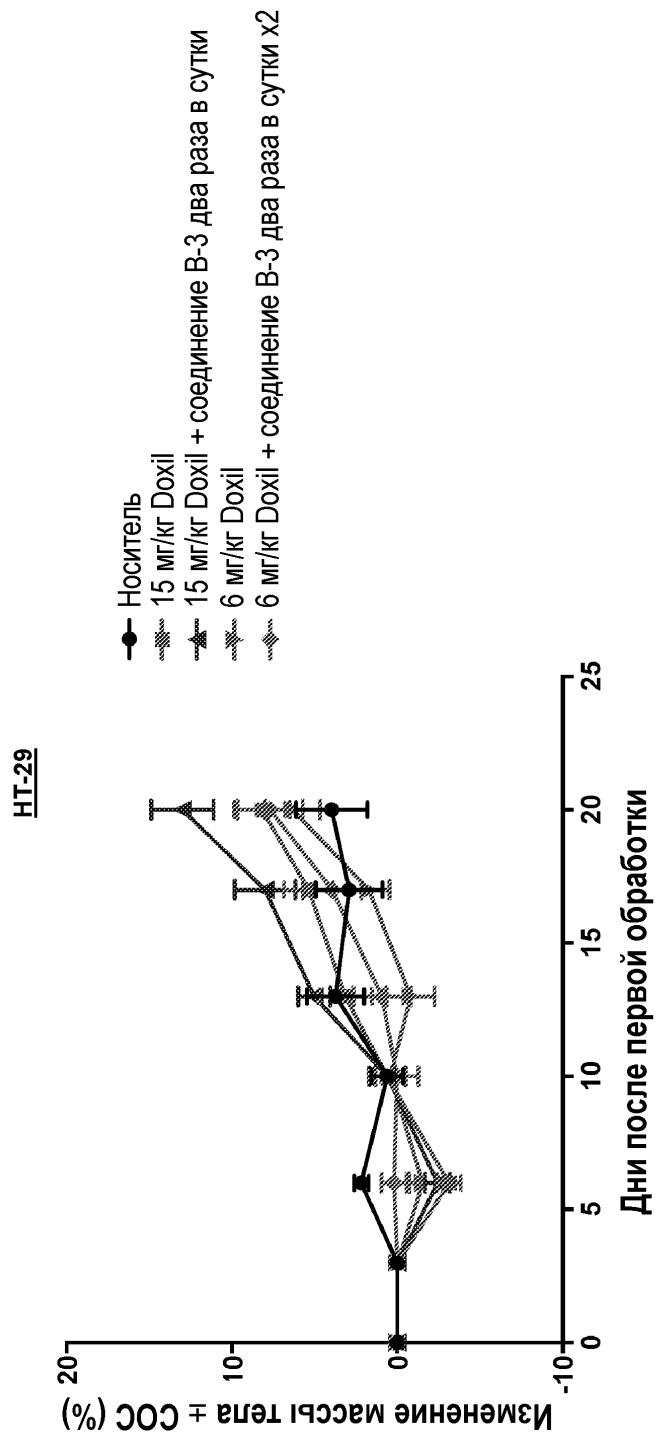
13/32

ФИГ.13



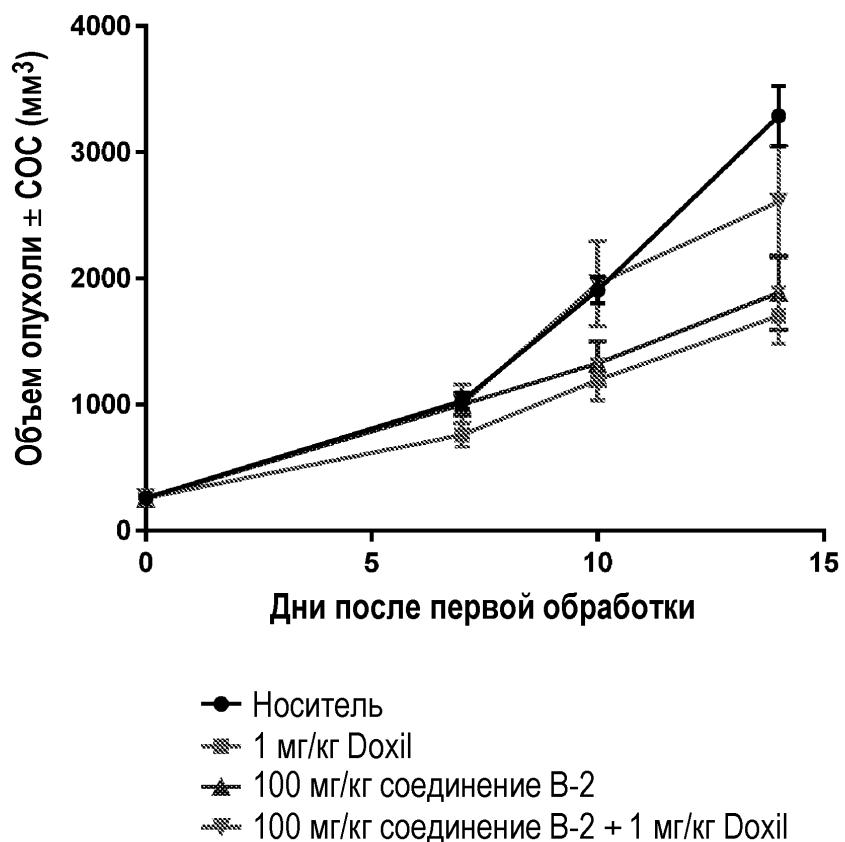
14/32

ФИГ. 14



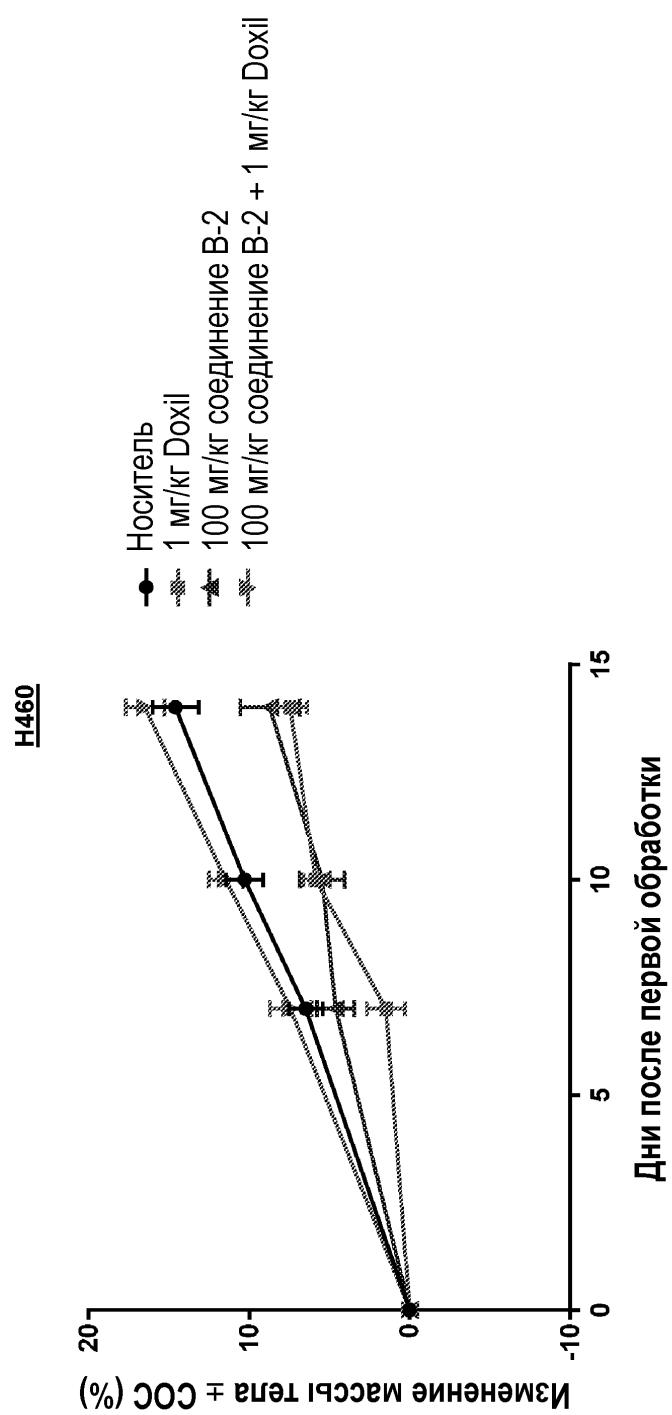
15/32

ФИГ.15

H460

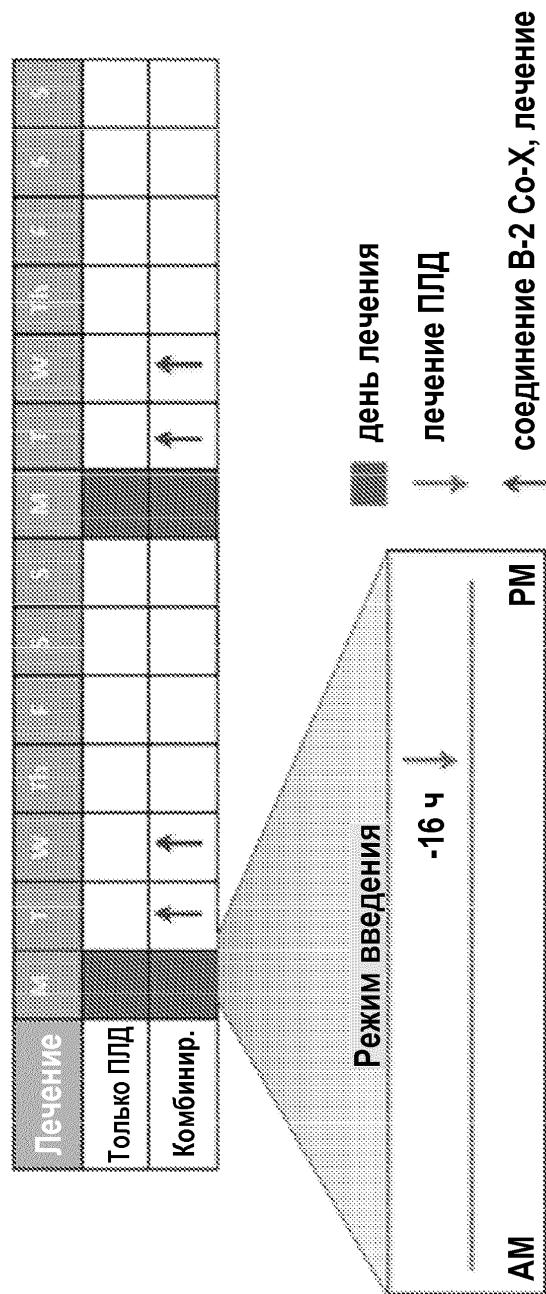
16/32

ФИГ. 16



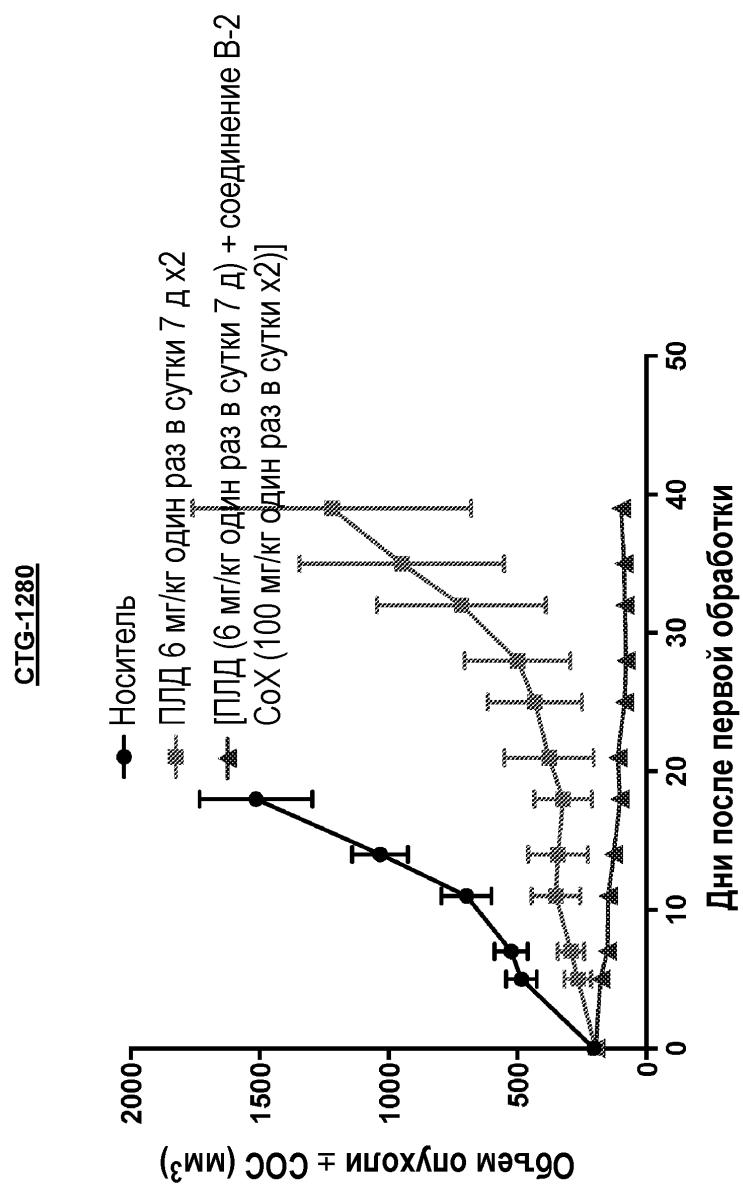
17/32

ФИГ. 17



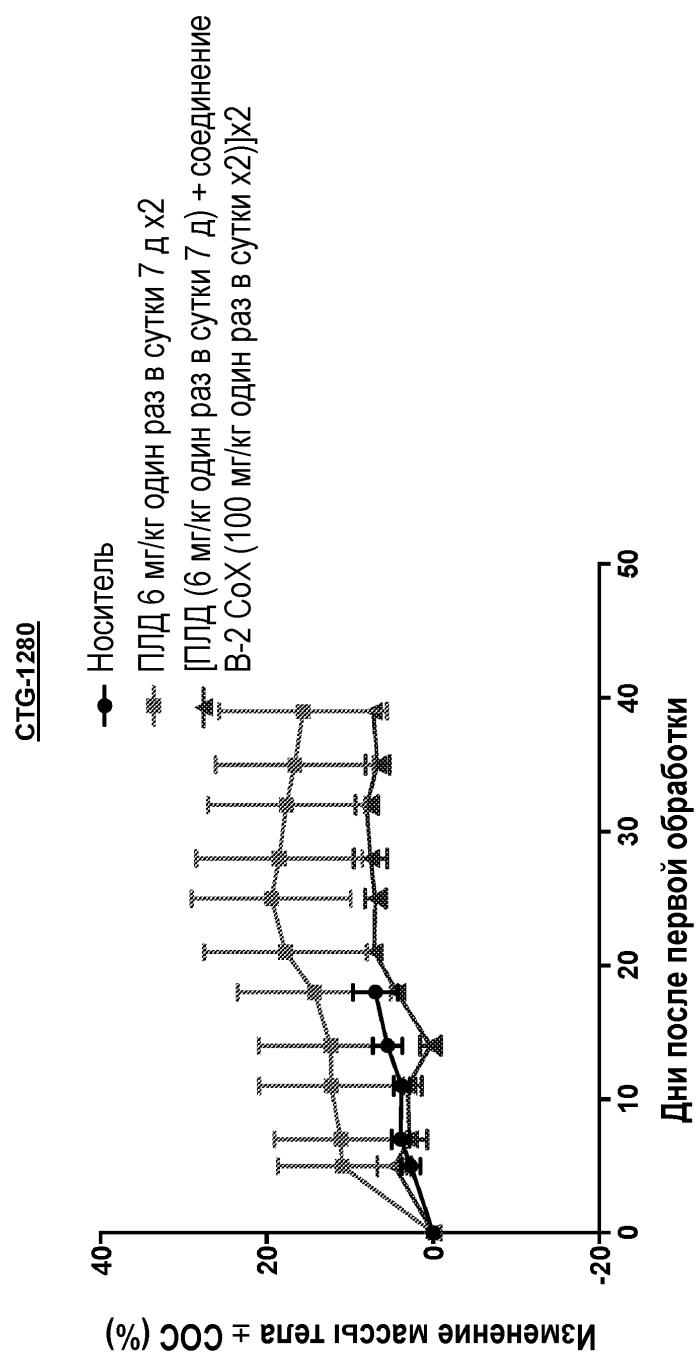
18/32

ФИГ. 18А



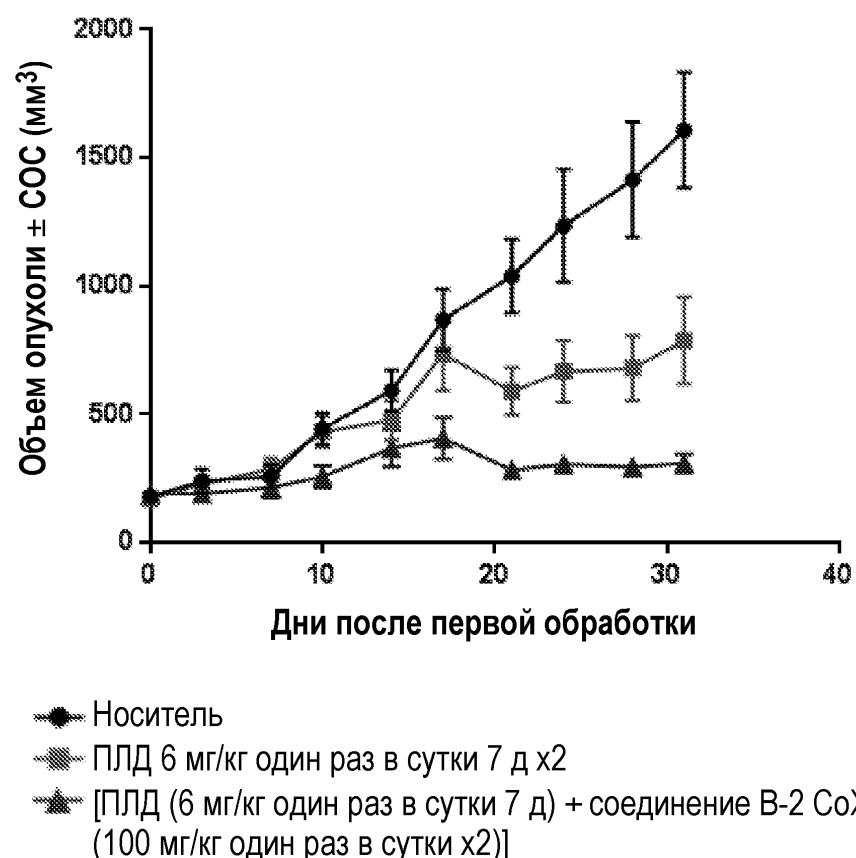
19/32

ФИГ. 18В



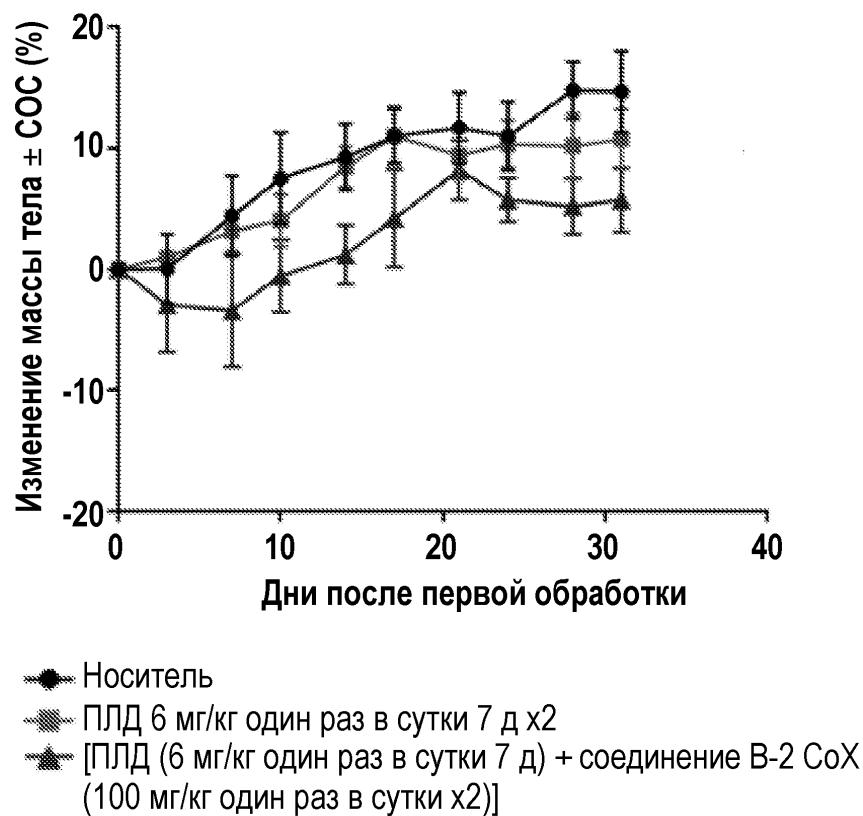
20/32

ФИГ.19В

CTG-0259

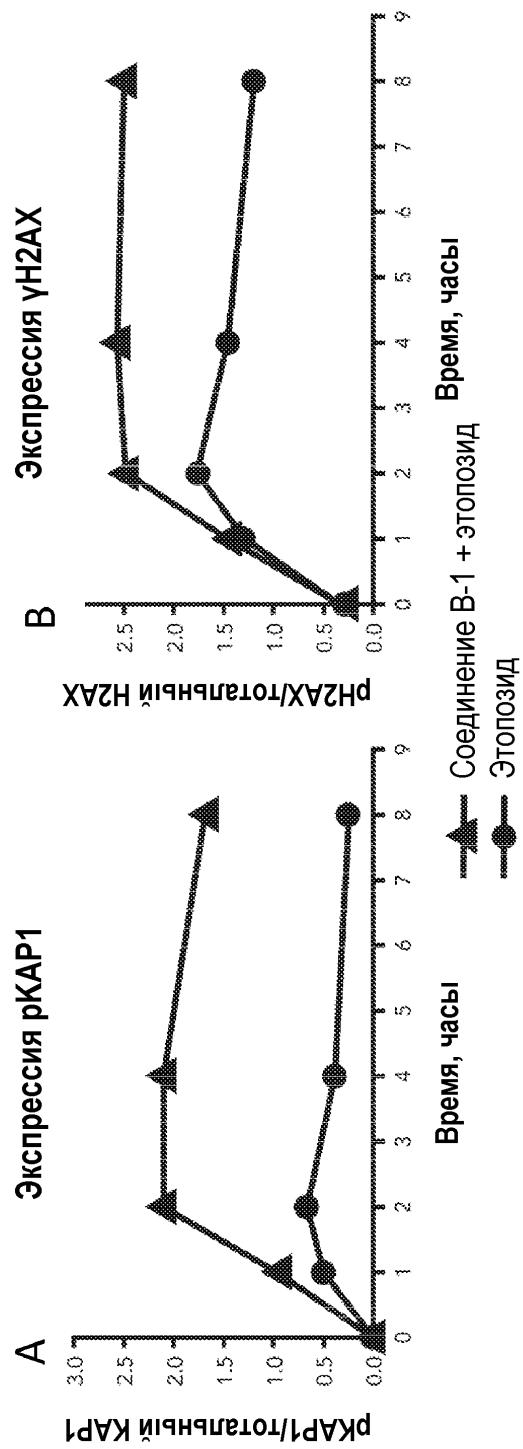
21/32

ФИГ.19А

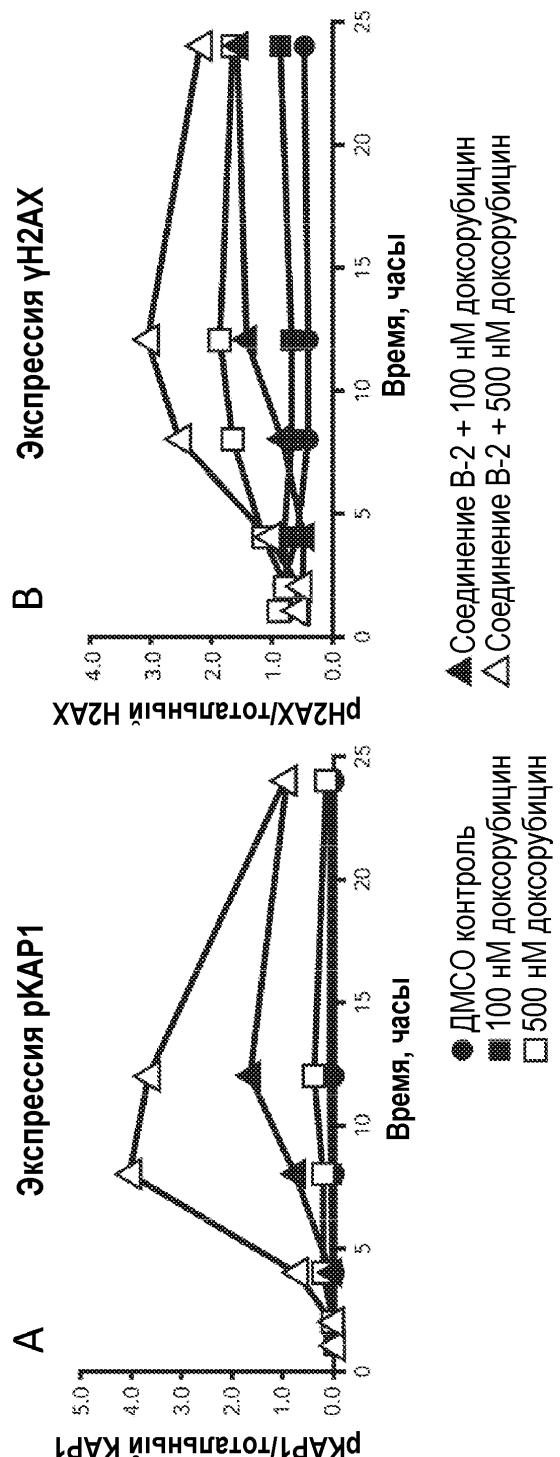
СТГ-0259

22/32

ФИГ.20А

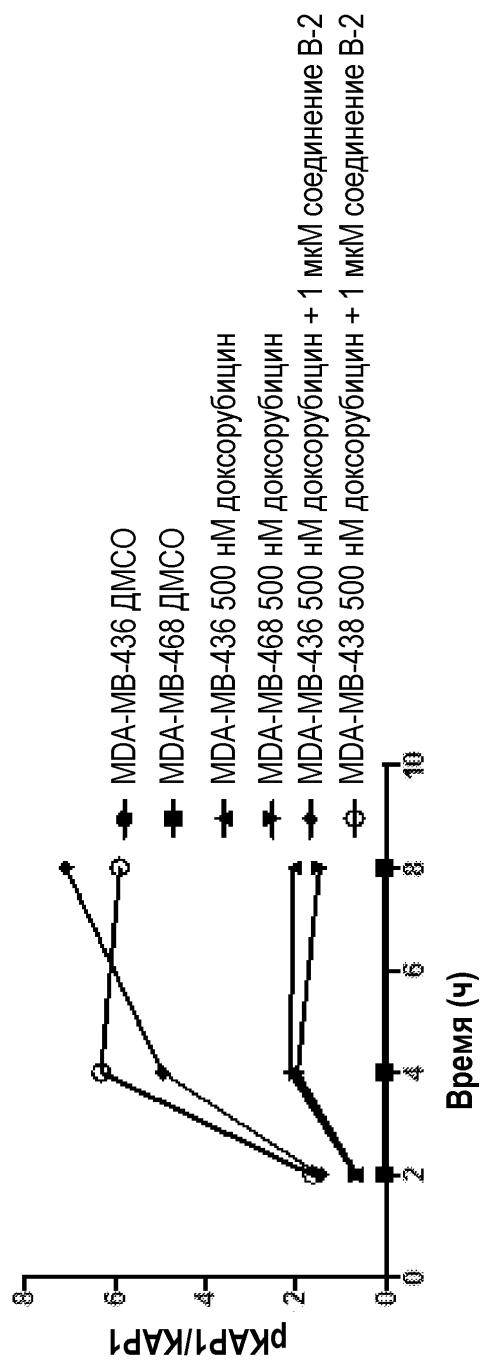


23/32

ФИГ.21А
ФИГ.21В

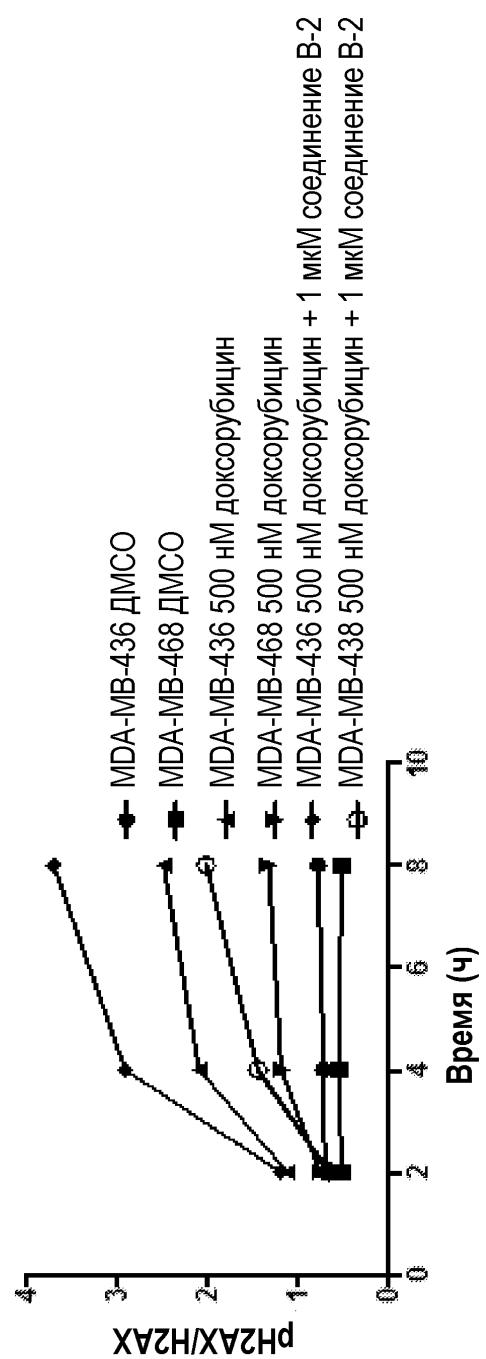
24/32

ФИГ.22A



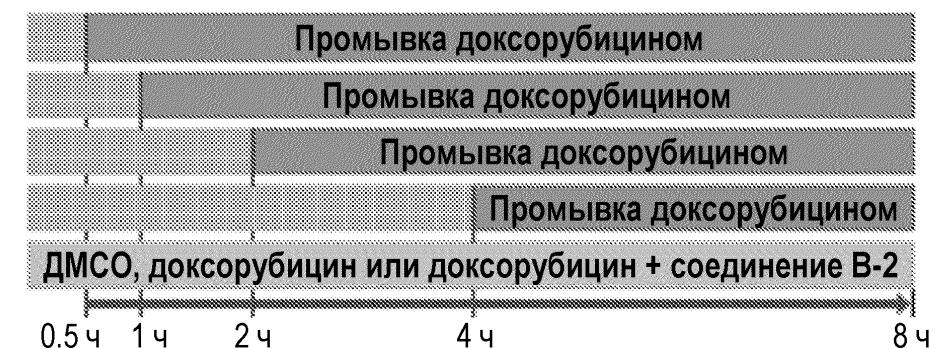
25/32

ФИГ.22В

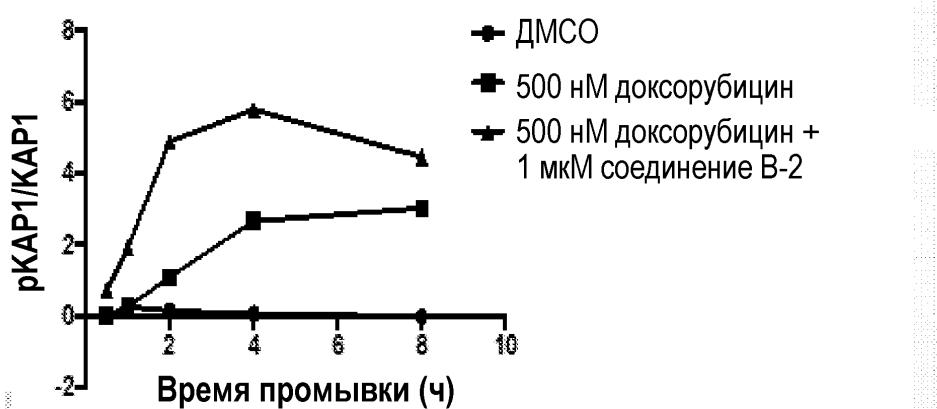


26/32

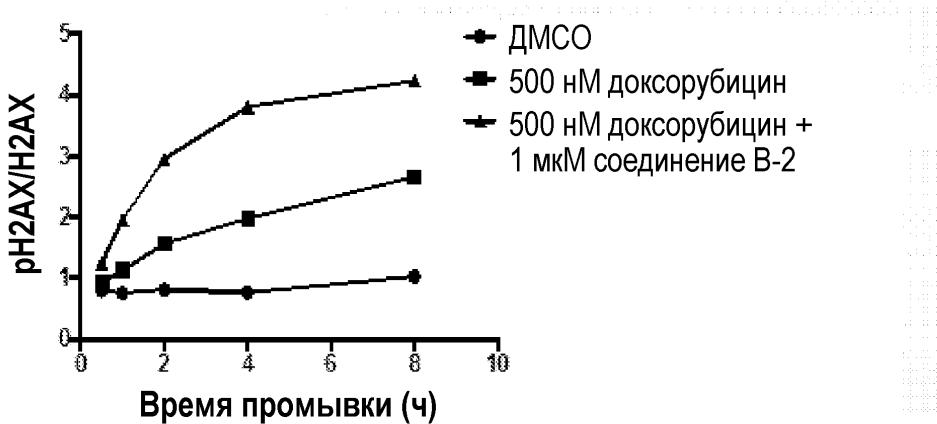
ФИГ.23А



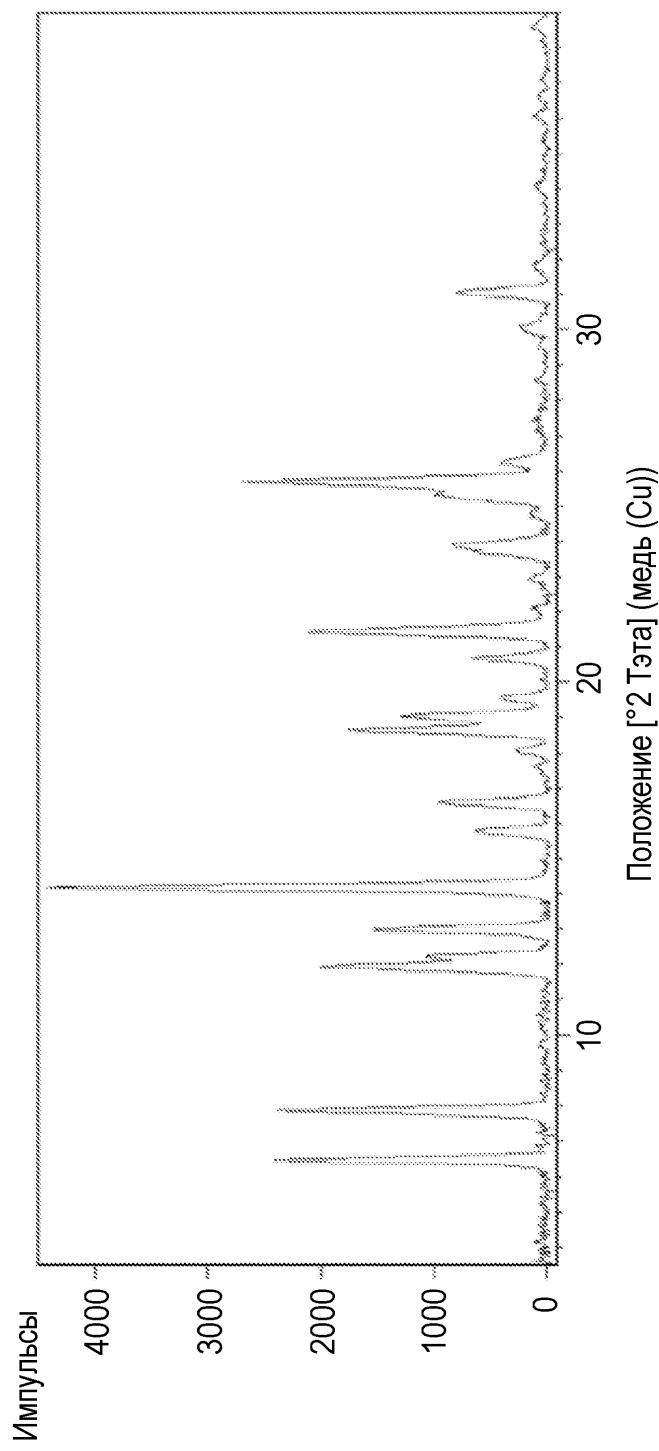
ФИГ.23В



ФИГ.23С

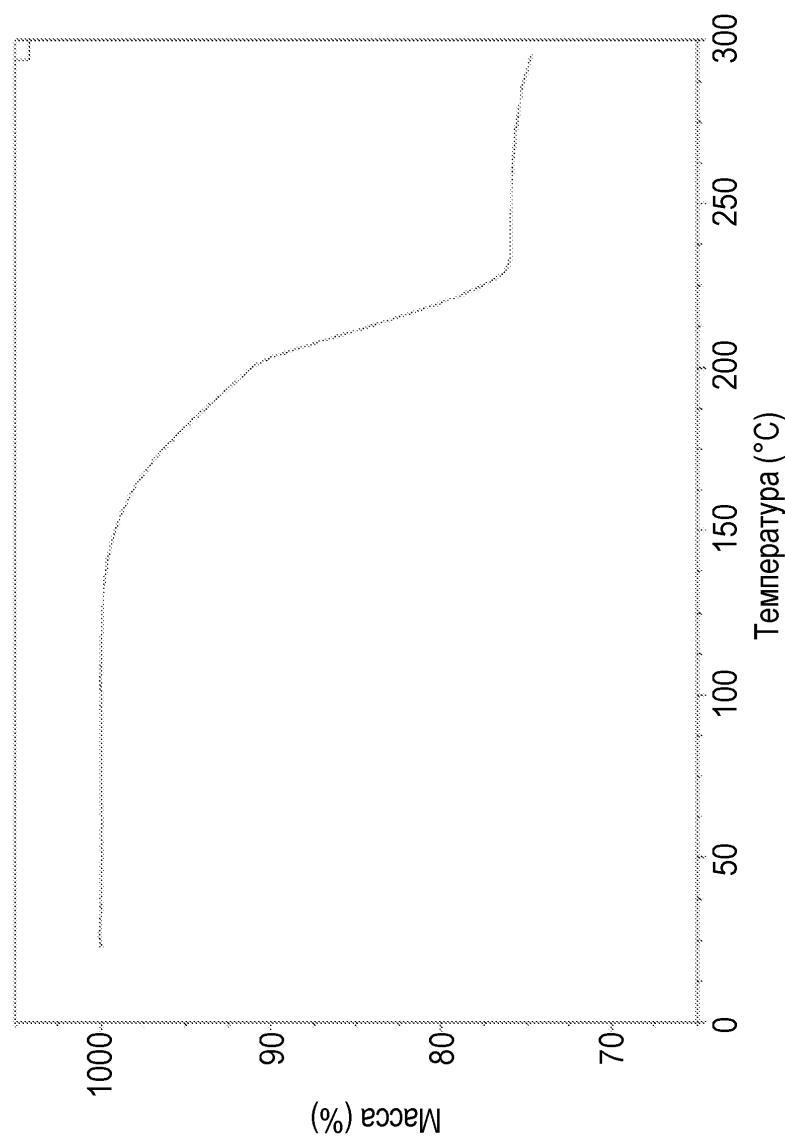


27/32



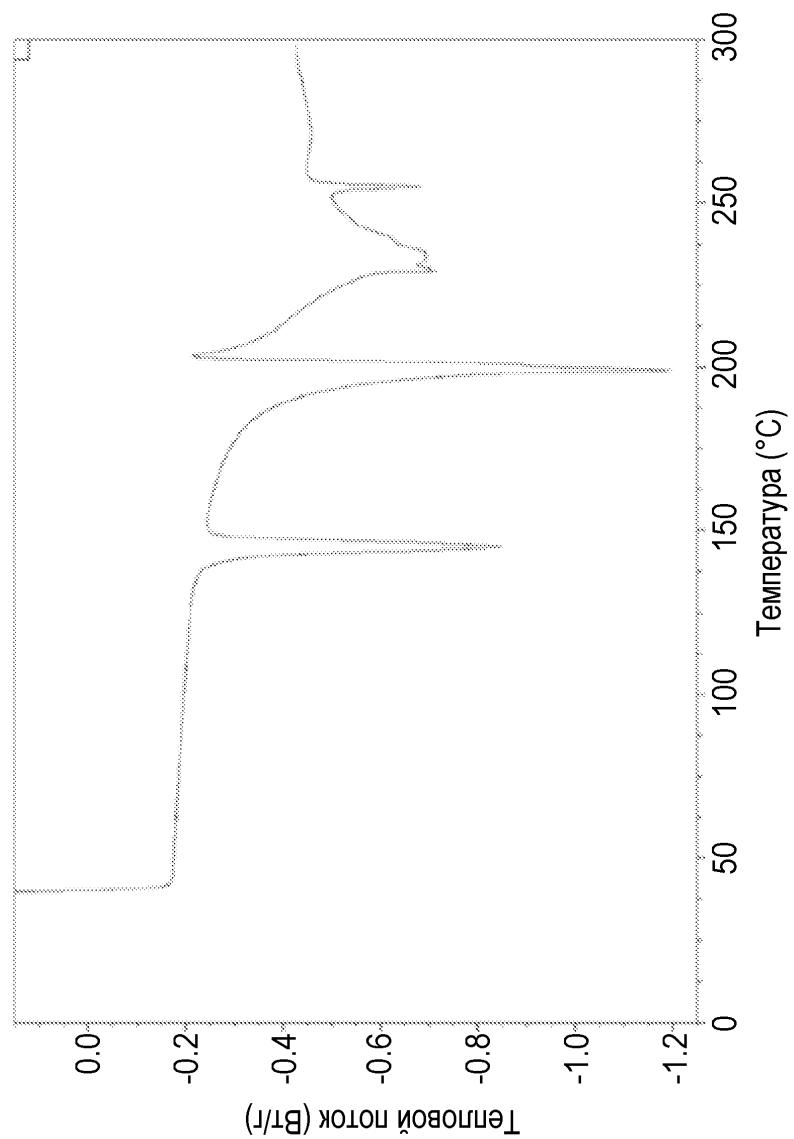
ФИГ.24

28/32



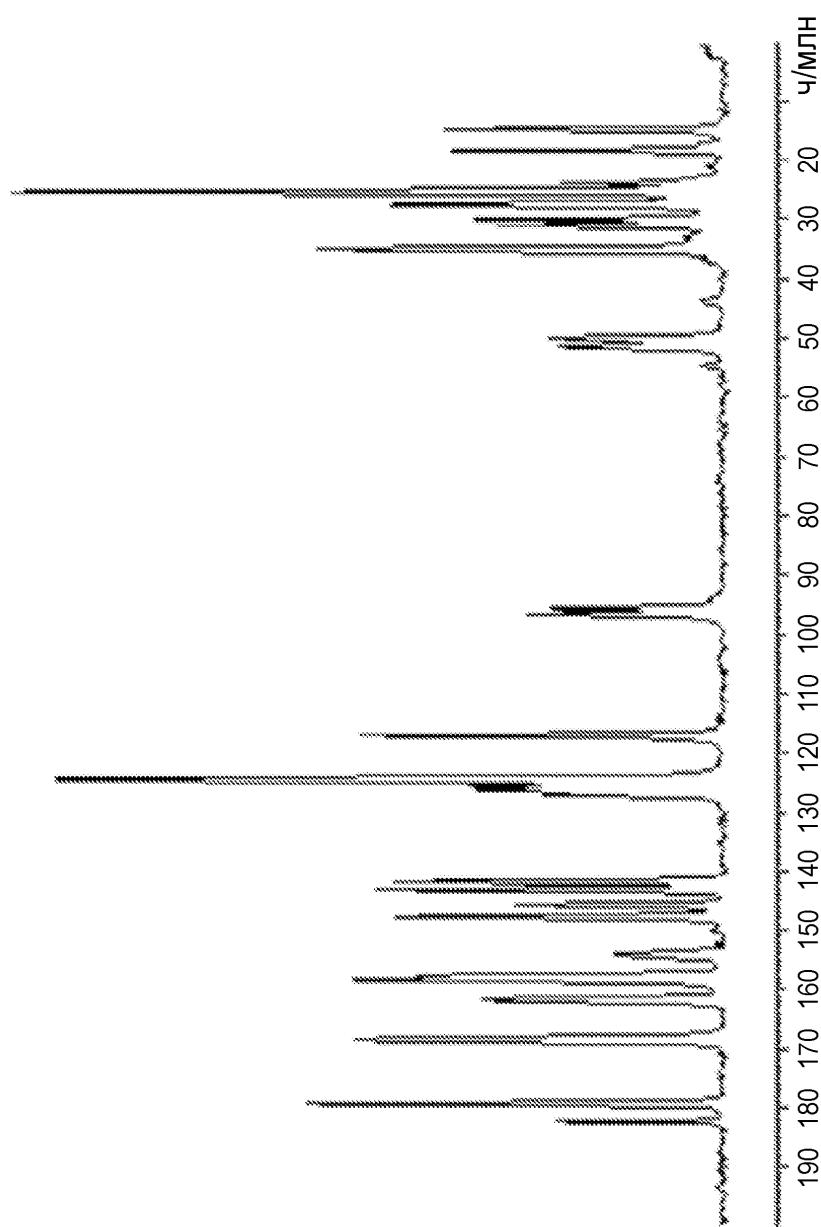
ФИГ. 25

29/32



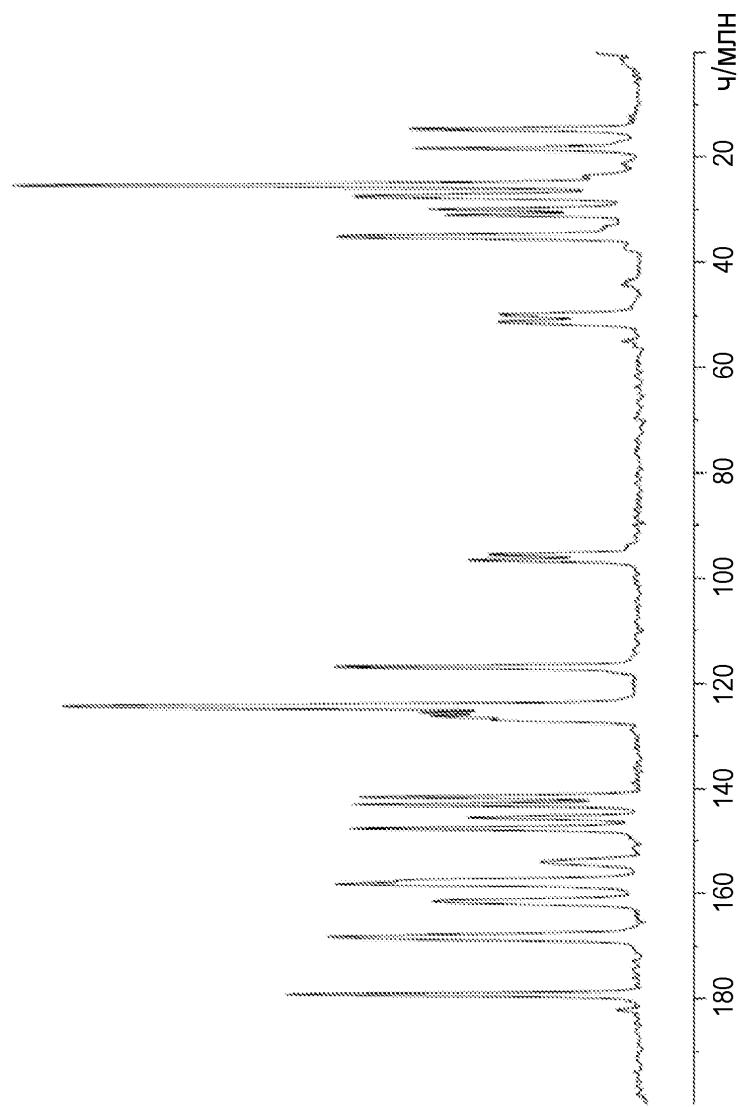
ФИГ.26

30/32



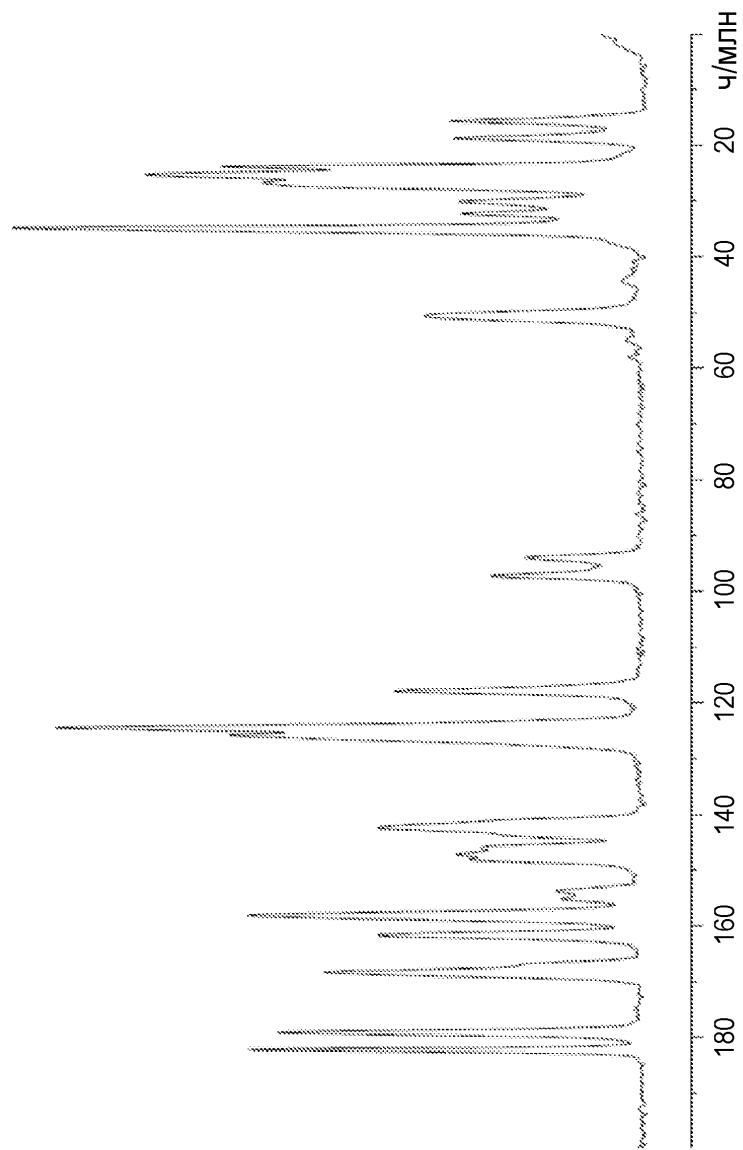
ФИГ.27

31/32



ФИГ.28

32/32



ФИГ.29