

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033925**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.10

(21) Номер заявки
201691907

(22) Дата подачи заявки
2015.04.06

(51) Int. Cl. *A61K 31/403* (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

(31) 61/975,865

(32) 2014.04.06

(33) US

(43) 2017.01.30

(86) PCT/US2015/024514

(87) WO 2015/157172 2015.10.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

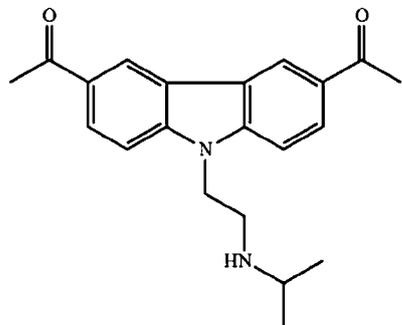
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ИНКУРОН" (RU)**

(72) Изобретатель:
Буркхарт Кэтрин (US)

(74) Представитель:
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**

(56) US-A1-20140066465
WO-A1-2013148864
WO-A2-2009143290

(57) Предложен способ лечения гепатоцеллюлярной карциномы, включающий введение эффективного количества CBL0137 и химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназы, нуждающемуся в этом субъекту, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназы, является сорафенибом, где CBL0137 имеет структурную формулу



033925 B1

033925 B1

Заявление приоритета

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/975865, поданной 6 апреля 2014 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение частично относится к способам лечения гепатоцеллюлярной карциномы, включая лечение путем введения эффективного количества CBL0137 и химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназы, который является сорафенибом.

Уровень техники

Многие виды раковой терапии затруднены неэффективностью против различных опухолей и вместе с этим проблематичным балансированием между эффективной дозой и побочными явлениями. Действительно, для раковой терапии является обычным применение различных агентов, в частности, когда клинические эффекты монотерапии не оправдывают ожиданий.

Следовательно, существует потребность в дополнительных подходах для лечения различных видов рака, которые улучшают клиническую эффективность обычной раковой терапии.

Сущность изобретения

Соответственно, в данном документе предложены способы, которые приводят к повышению эффективности раковой терапии путем повышения эффективности различных противораковых агентов, например, путем усиления действия, приводящего к уменьшению размеров опухоли, и/или снижения числа побочных эффектов терапии посредством снижения дозы без потери терапевтического действия. В различных аспектах настоящие способы обеспечивают синергетическое действие, благоприятное для пациента. В различных аспектах настоящие композиции и способы позволяют снижать дозу без потери клинического действия, тем самым уменьшая побочные эффекты и улучшая качество жизни пациента.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения гепатоцеллюлярной карциномы, включающий введение эффективного количества композиции CBL0137 субъекту, проходящему лечению химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ, который представляет собой сорафениб.

В различных вариантах реализации изобретения введение CBL0137 и сорафениба, позволяет проводить лечение субъекта субтерапевтической дозой CBL0137 и/или сорафениба. В различных вариантах реализации изобретения комбинирование агентов обеспечивает синергетическое действие и/или уменьшает у субъекта побочные эффекты лечения. Например, в различных вариантах реализации изобретения применение, например, CBL0137 и сорафениба обеспечивает более эффективное противораковое лечение (например, уменьшение роста опухоли) по сравнению с любым из агентов в отдельности.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 иллюстрирует кривые выживаемости Каплана-Мейера для несущих опухоль HerG2 бестимусных мышей. Панель А иллюстрирует кривую выживаемости для (HerG2-исследование) несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных (обозначение слева направо) базовым раствором (первый ряд) или разными схемами CBL0137 (третий ряд), сорафенибом (второй ряд) или CBL0137+сорафенибом (четвертый ряд). Панель В иллюстрирует кривую выживаемости для (HerG2 (частичная доза CBL0137)-исследование) несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных (обозначение слева направо) базовым раствором (первый ряд) или разными схемами CBL0137 (второй ряд), сорафенибом (третий ряд) или CBL0137+сорафенибом (четвертый ряд).

Фиг. 2 иллюстрирует кривые выживаемости Каплана-Мейера для групп несущих опухоль Her3В бестимусных мышей. В частности, панель А иллюстрирует кривую выживаемости для (Her3В-исследование) несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных (обозначение слева направо) базовым раствором (первый ряд) или разными схемами CBL0137 (второй ряд), сорафенибом (четвертый ряд) или CBL0137+сорафенибом (третий ряд). Панель В иллюстрирует кривую выживаемости для (Her3В (частичная доза CBL0137)-исследование) несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных (обозначение слева направо) базовым раствором (первый ряд) или разными схемами CBL0137 (второй ряд), сорафенибом (третий ряд) или CBL0137+сорафенибом (четвертый ряд).

Фиг. 3 иллюстрирует среднюю кратность изменения объема опухоли для групп несущих опухоль HerG2 бестимусных мышей. Панель А иллюстрирует среднюю кратность изменения объема опухоли (HerG2-исследование) для несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных базовым раствором или разными схемами CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом. Панель В иллюстрирует среднюю кратность изменения объема опухоли (HerG2 (часть дозы CBL0137)-исследование) для несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных базовым раствором или разными схемами CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом. КО обозначает конец обработки. Среднюю кратность роста опухоли рассчитывали, нормируя объем опухоли на день X к объему на день 1 для каждой отдельной опухоли (2 опухоли на мышь), а затем усредняя нормированные величины по всем опухолям в каждой группе. Для каждой группы данные представлены для тех временных точек, в которые проводили достаточное количество измерений, чтобы они могли считаться репрезентативными по группе (т.е. измерения для ≥ 50 % от общего числа животных в группе, чтобы избежать искажения данных). Усы представляют стандартные погрешности среднего значения.

Фиг. 4 иллюстрирует среднюю кратность изменения объема опухоли для групп несущих опухоль Her3В бестимусных мышей. Панель А иллюстрирует среднюю кратность изменения объема опухоли (Her3В-исследование) для несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных базовым раствором или разными схемами CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом. КО обозначает конец обработки. Панель В иллюстрирует среднюю кратность изменения объема опухоли (Her3В (часть дозы CBL0137)-исследование) для несущих опухоль бестимусных мышей, обработанных базовым раствором или разными схемами CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом. Среднюю кратность роста опухоли рассчитывали, нормируя объем опухоли на день X к объему на день 1 для каждой отдельной опухоли (2 опухоли на мышшь), а затем усредняя нормированные величины по всем опухолям в каждой группе. Для каждой группы данные представлены для тех временных точек, в которые проводили достаточное количество измерений, чтобы они могли считаться репрезентативными по группе (т.е. измерения для ≥ 50 % от общего числа животных в группе, чтобы избежать искажения данных). Усы представляют стандартные погрешности среднего значения.

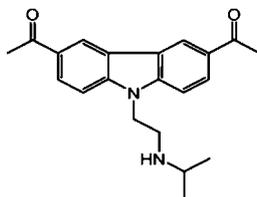
Фиг. 5 иллюстрирует вестерн-блоттинг-анализ для несущих опухоль HerG2 или Her3В бестимусных мышей, обработанных базовым раствором, CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом через 2 и 24 ч. В частности, методом вестерн-блоттинга отслеживали экспрессию spt16, SSRP1, p53, p21, P-ERK, ERK, Mcl-1 и GAPDH (контроль). Панель А соответствует несущим опухоль бестимусным мышам из HerG2-исследования, в то время как панель В соответствует несущим опухоль бестимусным мышам из Her3В-исследования.

Фиг. 6 иллюстрирует действие обработки CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафениб на экспрессию генов-мишеней NF-кВ для несущих опухоль HerG2 или Her3В бестимусных мышей. В частности, панели А и В соответствуют экспрессии ИЛ-8 и ФНО, соответственно, у несущих опухоль HerG2 бестимусных мышей после обработки ДМСО, CBL0137, сорафенибом, CBL0137+сорафенибом, ДМСО+ФНО, CBL0137+ФНО, сорафенибом+ФНО или CBL0137+сорафенибом+ФНО. Панели С и D соответствуют экспрессии ИЛ-8 с ФНО, соответственно, у несущих опухоль Her3В бестимусных мышей после обработки ДМСО, CBL0137, сорафенибом, CBL0137+сорафенибом, ДМСО+ФНО, CBL0137+ФНО, сорафенибом+ФНО или CBL0137+сорафенибом+ФНО.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что CBL0137 может оказывать синергетическое действие в случае применения в комбинации с различными агентами, включая химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназ (сорафениб), и, следовательно, увеличивать эффективность терапевтического окна этих видов лечения (включая возможность введения субтерапевтических доз). Соответственно, в настоящем изобретении предложены улучшенные способы лечения рака.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества композиции CBL0137 субъекту, проходящему лечение химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества CBL0137 последовательно или одновременно с введением эффективного количества химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназ, нуждающемуся в этом субъекту. CBL0137, также известный как кураксин-137, описан в Международной патентной публикации № WO 2010/042445, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Структура CBL0137 может быть представлена следующим образом:



В различных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназ, ингибирует одну или более из тирозинпротеинкиназ (например, VEGFR, PDGFR), Raf-киназ (например, C-Raf, B-Raf) и внутриклеточных серин/треонинкиназ (например, C-Raf, B-Raf дикого типа и мутантную B-Raf). В конкретном варианте реализации изобретения химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназ, представляет собой сорафениб (например, NEXAVAR).

В различных вариантах реализации изобретения CBL0137, применяемый в отношении пациента, проходящего лечение химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом), или применяемый в виде совместного препарата или совместного введения (например, последовательно или одновременно) с химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом), расширяет терапевтическое окно химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназ (сорафениба), и/или CBL0137.

Например, такое введение может сделать возможным применение субтерапевтической дозы любого из агентов. В различных вариантах реализации изобретения субтерапевтическая доза CBL0137 и/или химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназ, составляет менее чем около 50% или менее чем около 60%, или менее чем около 70%, или менее чем около 80%, или менее чем около 85%, или менее чем около 90% от утвержденной дозы и/или максимальной переносимой дозы (МПД). В различных вариантах реализации изобретения применение субтерапевтической дозы ощутимо не влияет на степень терапевтического действия любого из агентов или комбинации агентов. Например, в случае сорафениба лечение может включать 400 мг ежедневно и, в некоторых вариантах реализации изобретения, субтерапевтическая доза включает введение около 400 мг ежедневно или около 480 мг ежедневно, или около 560 мг ежедневно, или около 640 мг ежедневно, или около 680 мг ежедневно, или около 720 мг ежедневно. Настоящее изобретение делает возможным введение раз в день или два раза в день. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее изобретение делает возможным применение полной дозы раз в день и позволяет избежать проблем, связанных с соблюдением пациентом режима двухразового введения. Кроме того, для некоторых пациентов требуется снижение дозы сорафениба в связи с побочными эффектами (например, снижение до 400 мг один раз в день, снижение до 400 мг через день). В некоторых вариантах реализации изобретения предложенные способы позволяют предотвратить необходимость в таком снижении дозы.

Кроме того, в различных вариантах реализации изобретения CBL0137, применяемый в отношении пациента, проходящего лечение химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом), или применяемый в виде совместного препарата или совместного введения (например, последовательно или одновременно) с химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом), позволяет снижать дозу, что, соответственно, обеспечивает уменьшение побочных эффектов. Например, можно уменьшить или устранить один или более из следующих побочных эффектов сорафениба: лимфопению, гипофосфатемию, кровоизлияние, повышенное кровяное давление, диарею, сыпь, алопецию, ладонно-подошвенный синдром, зуд, покраснение, повышенный уровень амилазы, повышенный уровень липазы, утомляемость, боль, тошноту, рвоту, лейкопению, нейтропению, анемию, тромбоцитопению, анорексию, потерю массы, гипокальциемию, гипокалиемию, депрессию, периферическую сенсорную нейропатию, шум в ушах, застойную сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, миокардиальную ишемию, охриплость, запор, стоматит, расстройство пищеварения, расстройство глотания, сухость кожи, эксфолиативный дерматит, акне, шелушение кожи, артралгию, миалгию, почечную недостаточность, протеинурию, эректильную дисфункцию, астению, лихорадку и гриппоподобное заболевание.

В различных вариантах реализации изобретения расширение терапевтического окна CBL0137 и/или химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназ (сорафениба), включает одно или более из увеличения вероятности получения раковым пациентом поддерживающей терапии CBL0137 и/или химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом); увеличения вероятности получения раковым пациентом полной схемы лечения CBL0137 и/или химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом); увеличения вероятности получения раковым пациентом более чем полной схемы лечения CBL0137 и/или химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом); и увеличения дозы или длительности лечения CBL0137 и/или химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом).

В различных вариантах реализации изобретения комбинация CBL0137 и химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназ (сорафениба), оказывает синергетическое действие. В некоторых вариантах реализации изобретения синергетическое действие состоит в замедлении роста опухоли или снижении количества генов NF-κB, или снижении или практически полном прекращении экспрессии одного или более из ФНО и ИЛ-8.

В некоторых вариантах реализации изобретения, как описано в данном документе, множество видов рака (включая первичные или вторичные опухоли) можно лечить посредством монотерапии CBL0137 (включая, но не ограничиваясь этим, монотерапию в отношении пациента, проходящего лечение другим агентом, например, сорафенибом) или комбинированную терапию с химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназ (сорафенибом).

В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак печени. В некоторых вариантах реализации изобретения рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК).

В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени представляет собой первичный рак печени. В различных вариантах реализации изобретения первичный рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК). В различных вариантах реализации настоящее изобретение включает лечение первичного рака печени, который связан с одним или более из следующих факторов риска рака печени: цирроз, умеренное потребление алкоголя (включая алкоголизм), неалкогольная жировая болезнь печени, инфицирование вирусами гепатита, курение, низкий иммунитет, семейный анамнез, диабет, удаление желчного пузыря, облучение при рентгенокопии или КТ-

сканировании, большая масса тела, употребление бетеля и употребление афлатоксинов.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак печени представляет собой вторичный рак печени. В различных вариантах реализации изобретения вторичный рак печени развивается из одного или более типов первичного рака, которые часто метастазируют в печень, включая, например, рак толстой кишки, легкого, желудка, поджелудочной железы, молочной железы, желчных протоков, пищевода, яичника, простаты, почек и меланому.

В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени характеризуется наличием одного или более тканевых маркеров рака печени, выбранных, например, из: GPC3; GPC3+белка теплового шока 70+глутаминсинтетазы; теломеразы; индекса включения метки ядерного антигена клеточной пролиферации; Ki-67; MIB-1 E-кадгерина и β -катенина. В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени характеризуется наличием одного или более сывороточных маркеров рака печени, выбранных, например, из: AFP; AFP-конканавалина А; связывания AFP-LCA; ГЦК-специфической полосы AFP при изоэлектрическом фокусировании (моносиалированный AFP); лектин-аффинных подгрупп AFP (LCA-реактивный LCA-L3; эритроагглютинирующий фитогемагглютинин-E4-реактивный AFP-P4 и P5); циркулирующих свободных комплексов AFP-IgM; DCP/протромбина II, вырабатываемого при отсутствии или антагонизировании витамина К; растворимого NH₂-фрагмента GPC-3, гепаринсульфат протеогликана; белка Гольджи 73; изо-уGTP; ферритина; вариантной щелочной фосфатазы; α 1-антитрипсина; α 1-кислого гликопротеина; остеопонтина; альдолазы А; 5[первичной]-нуклеотидфосфодиэстеразы; CK18, CK19, TPA, TPS; циркулирующих свободных комплексов антиген плоскоклеточной карциномы-IgM; α -фукозилтрансферазы; α -L-фукозидазы; трансформирующего фактора роста β 1; внутриклеточной молекулы клеточной адгезии 1; анти-p53 антитела; интерлейкина 8; интерлейкина 6; инсулин-подобного фактора роста II; теломеразы или мРНК обратной транскриптазы теломеразы; фактора роста эндотелия сосудов; варианта рецептора эстрогена дикого типа; связывающего витамин В12 белка; нейротензина; свободных нуклеиновых кислот; циркулирующей внеклеточной сывороточной ДНК; эпигенетических аномалий, таких как, например, гиперметилование p16; и плазменной протеасомы.

В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени характеризуется наличием одного или более опухолевых маркеров рака печени, выбранных, например, из: циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, выявляемых ОФ-ПЦР мРНК AFP. В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени характеризуется наличием одного или более генетических маркеров рака печени, выбранных, например, из: плазменных глутамат карбоксипептидаз фосфолипаз A2 G13 и G7 и других кодируемых с микроматрицы кДНК белков; гена антигена меланомы 1, 3; синовиальной саркомы на X-хромосоме 1, 2, 4, 5; саркоплазматического кальций-связывающего белка 1; нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1; и циркулирующей метилированной ДНК (семейство gas-ассоциированных доменов 1 А).

В некоторых вариантах реализации изобретения рак печени экспрессирует альфа-фетопротеин. Дополнительные подробности в отношении маркеров, которые определяют, в некоторых вариантах реализации изобретения, рак печени согласно настоящему изобретению, можно найти, например, в Sturgeon, et al., Use of Tumor Markers in Liver, Bladder, Cervical, and Gastric Cancers American Association for Clinical Chemistry, Inc. (2010), содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени классифицируется как один или более из локализованного операбельного, локализованного неоперабельного, распространенного и рецидивирующего. В различных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе рак печени классифицируется согласно системе стадирования AJCC (TNM). Стадии обозначают римскими цифрами от I до IV (1-4). Некоторые стадии дополнительно подразделяют на А и В или даже С. В большинстве случаев, чем меньше цифра, тем меньше распространение рака. Большие цифры, такие как стадия IV (4), обозначают более распространенный рак.

В различных вариантах реализации изобретения СВL0137 и/или химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназ, вводят внутривенно и/или перорально.

В различных вариантах реализации изобретения агенты согласно настоящему изобретению применимы в качестве адьювантной терапии. Адьювантная терапия представляет собой лечение, которое проводится в дополнение к первичному или основному лечению. В различных вариантах реализации изобретения пациент проходит один или более видов первичной или основной терапии. СВL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) можно вводить в сочетании с первичным или основным лечением. Например, СВL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, например, сорафениб) могут быть адьювантами для резекции первичной(ых) опухоли(ей).

Также в различных вариантах реализации изобретения настоящие агенты применимы в качестве неоадьювантной терапии. Неоадьювантная терапия относится к терапии, которая проводится до первичного или основного лечения, часто для того, чтобы подготовить пациента к первичному или основному

лечению. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения лечение настоящими агентами снижает тяжесть заболевания и делает его более поддающимся первичному или основному лечению. В конкретном варианте реализации изобретения СВL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафенибприменяют для лечения пациента, чтобы подготовить его к последующей резекции (например, хирургической резекции).

В различных вариантах реализации изобретения также предложены дополнительные комбинационные агенты, которые включают, но не ограничиваются этим, алкилирующие агенты, такие как

- тиотепа и ЦИТОКСАН циклофосфамид;
- алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан;
- азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа;
- этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиотрифосфорамид и триметилмеламин;
- ацетогенины (например, буллатацин и буллатацинон);
- камптотектин (включая синтетический аналог топотекан);
- бриостатин;
- каллистатин;
- СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и биззелезин);
- криптофицины (например, криптофицин 1 и криптофицин 8);
- доластатин;
- дуокармицин (включая синтетические аналоги, КW-2189 и СВ1-ТМ1);
- элеутеробин;
- панкратистатин;
- саркодиктин;
- спонгистатин;
- азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт;
- нитромочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин;
- антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в особенности калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)));
- динемицин, включая динемицин А;
- бисфосфонаты, такие как клодронат;
- эсперамицин;
- а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромофоры хромопротеиновых энединовых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин АДРИАМИЦИН (включая морфолинодоксорубицин, циано-морфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин;
- антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU);
- аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат;
- пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин;
- пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин;
- андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон;
- антиадреналины, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; возполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота;
- ацеллатон;
- альдофосфамидгликозид;
- аминолевулиновую кислоту;
- энилурацил;
- амсакрин;
- бестрабуцил;
- бисантрен;
- эдатраксат;
- дефофамин;
- демеколцин;

диазиквон;
элфорнитин;
эллиптиния ацетат;
эпотилон;
этоглуцид;
нитрат галлия;
гидроксимочевину;
лентинан;
лонидаинин;
майтанзиноиды, такие как мйтанзин и ансамитоцины;
митогуазон;
митоксантрон;
мопиданмол;
нитраэрин;
пентостатин;
фенамет;
пирарубицин;
лозоксантрон;
подофиллиновую кислоту;
2-этилгидразид;
прокарбазин;
полисахаридный комплекс PSK (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.);
разоксан;
ризоксин;
сизофиран;
спирогерманий;
тенуазоновую кислоту;
триазиквон;
2,2',2"-трихлортриэтиламин;
трихотецены (например, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин);
уретан;
виндезин;
дакарбазин;
манномустин;
митобронитол;
митолактол;
пипоброман;
гацитозин;
арабинозид ("Ага-С");
циклофосфамид;
тиотепу;
таксоиды, например, паклитаксел ТАКСОЛ (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), не содержащий кремофор АБРАКСАН, препараты из наночастиц паклитаксела, сконструированные на основе альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.) и доксетаксел ТАКСОТЕР (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France);
хлоранбуцил;
6-тиогуанин;
меркаптопурин;
метотрексат;
аналоги платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин;
винбластин;
платину;
этопозид (VP-16);
ифосфамид;
митоксантрон;
винкристин;
винорелбин НАВЕЛБИН;
новантрон;
тенипозид;
эдатрексат;
дауномицин;
аминоптерин;

кселоду;
 ибандронат;
 иринотекан (камптозар, СРТ-11) (включая схему лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином);
 ингибитор топоизомеразы RFS 2000;
 дифторметилорнитин (DMFO);
 ретиноиды, такие как ретиноевая кислота;
 капецитабин;
 комбретастатин;
 лейковорин (ЛВ);
 оксалиплатин, включая схему лечения оксалиплатином (ФОЛФОКС);
 лапатиниб (Тайкерб);
 ингибиторы РКС-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (например, эрлотиниб (Тарцева)) и VEGF-A, которые снижают клеточную пролиферацию, и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше соединений.

Кроме того, способы лечения могут дополнительно включать применение облучения. Кроме того, способы лечения могут дополнительно включать применение фотодинамической терапии.

Как указано выше, в различных вариантах реализации настоящее изобретение относится к ракам и/или опухолям; например, лечению или предотвращению раков и/или опухолей. В контексте данного документа "рак" или "опухоль" относится к нерегулируемому росту клеток и/или аномальной выживаемости клеток, и/или ингибированию апоптоза, которое препятствует нормальному функционированию органов и систем организма. Включены доброкачественные и злокачественные раки, полипы, гиперплазия, а также латентные опухоли и микрометастазы. Также включены клетки, характеризующиеся аномальной пролиферацией, которая не подавляется иммунной системой (например, инфицированные вирусом клетки). Субъектом, у которого есть рак или опухоль, является субъект, в организме которого присутствуют объективно определяемые раковые клетки. Рак, которые перемещается относительно изначальной локации и поражает жизненно важные органы, может в конечном итоге привести к смерти субъекта вследствие функционального нарушения пораженных органов.

Рак может представлять собой первичный рак или метастатический рак. Первичным раком может быть участок раковых клеток в месте возникновения, который становится клинически выявляемым, и может являться первичной опухолью. В противоположность этому, метастатическим раком может быть распространение заболевания из одного органа или части в другой несмежный орган или часть. Причиной метастатического рака может быть раковая клетка, которая становится способной проникать и инфильтрировать окружающие нормальные ткани в локальном участке, образуя новую опухоль, которая может являться локальным метастазом. "Метастаз" относится к распространению рака от первичного участка в другие участки организма. Раковые клетки могут отрываться от первичной опухоли, проникать в лимфатические и кровеносные сосуды, циркулировать в кровотоке и расти в отдаленных очагах (метастазировать) в нормальных тканях в любом месте организма. Метастаз может быть локальным или отдаленным. Метастаз представляет собой многостадийный процесс, возможный при условии отрыва опухолевых клеток от первичной опухоли, перемещения через кровоток и остановки в отдаленном участке. В новом участке клетки налаживают кровоснабжение и могут расти, образуя массу, несущую угрозу для жизни. Это поведение регулируется как стимуляторными, так и ингибиторными молекулярными путями в раковой клетке, и также имеют значение взаимодействия между опухолевой клеткой и клетками-хозяевами в отдаленном участке. Метастазы можно выявлять при помощи отдельного или комбинированного применения магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии (КТ), подсчета кровяных телец и тромбоцитов, исследования функции печени, рентгеноскопии грудной клетки и остеосцинтиграфии в дополнение к отслеживанию специфических симптомов.

Причиной рака также может быть раковая клетка, которая становится способной проникать через стенки лимфатических и/или кровеносных сосудов, после чего раковая клетка может циркулировать в кровотоке (становясь, таким образом, циркулирующей раковой клеткой), достигая других участков и тканей в организме. Рак может возникать вследствие такого процесса, как лимфогенное или гематогенное распространение. Причиной рака также может быть опухолевая клетка, которая остановилась в другом участке, повторно проникла через сосуд или стенки, продолжает размножаться и в конечном итоге формирует другую клинически выявляемую опухоль. Рак может представлять собой такую новую опухоль, которая может быть метастатической (вторичной) опухолью.

Причиной рака могут быть метастазировавшие опухолевые клетки, которые могут формировать вторичную или метастатическую опухоль. Клетки этой опухоли могут быть подобны клеткам первичной опухоли. Например, когда рак молочной железы или рак толстой кишки метастазирует в печень, вторичная опухоль, хотя находится в печени, состоит из аномальных клеток молочной железы или толстой кишки, а не аномальных клеток печени. Таким образом, опухоль в печени может быть метастатическим раком молочной железы или метастатическим раком толстой кишки, а не раком печени.

Рак может происходить из любой ткани. Рак может происходить из меланомы, толстой кишки, молочной железы или простаты и, таким образом, может состоять из клеток, которые изначально были

клетками, соответственно, кожи, толстой кишки, молочной железы или простаты. Рак также может представлять собой гематологическую злокачественную опухоль, которая может быть лимфомой.

Типовые виды рака и/или опухоли согласно настоящему изобретению включают гепатокарциному; гепатому.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб включает производные, которые модифицированы, например, посредством ковалентного присоединения к композиции молекулы любого типа так, что ковалентное присоединение не препятствует активности композиции. В качестве примера, но не в качестве ограничения, производные включают композиции, которые были модифицированы, помимо прочего, путем гликозилирования, липидизации, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, присоединения к клеточному лиганду или другому белку и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществлять при помощи известных методов, включая, но не ограничиваясь этим, специальное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

В дополнительных вариантах реализации изобретения описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб можно модифицировать так, чтобы добавить эффекторные компоненты, такие как химические линкеры, выявляемые компоненты, такие как, например, флуоресцентные красители, ферменты, субстраты, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы и хемилюминесцентные компоненты, или функциональные компоненты, такие как, например, стрептавидин, авидин, биотин, цитотоксин, цитотоксический агент и радиоактивные материалы.

Описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб может содержать в достаточной степени основную функциональную группу, которая может вступать в реакцию с неорганической или органической кислотой, или карбоксильную группу, которая может вступать в реакцию с неорганическим или органическим основанием с образованием фармацевтически приемлемой соли. Фармацевтически приемлемая кислотная аддитивная соль образуется из фармацевтически приемлемой соли, как хорошо известно в данной области техники. Такие соли включают фармацевтически приемлемые соли, приведенные, например, в *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) и *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В качестве неограничивающего примера фармацевтически приемлемые соли включают сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, камфорсульфонат, памоат, фенилацетат, трифторацетат, акрилат, хлорбензоат, динитробензоат, гидроксibenзоат, метоксибензоат, метилбензоат, о-ацетоксибензоат, нафтален-2-бензоат, изобутират, фенилбутират, α -гидроксibuтират, бутин-1,4-дикарбоксилат, гексин-1,4-дикарбоксилат, капрат, каприлат, циннамат, гликолат, гептаноат, гиппурат, малат, гидроксималеат, малонат, манделат, мезилат, никотинат, фталат, терафталат, пропионат, пропионат, фенилпропионат, себацат, суберат, п-бромбензолсульфонат, хлорбензолсульфонат, этилсульфонат, 2-гидроксиэтилсульфонат, метилсульфонат, нафтален-1-сульфонат, нафтален-2-сульфонат, нафтален-1,5-сульфонат, ксиленсульфонат и тартарат.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" также относится к соли композиций согласно настоящему изобретению, содержащей функциональную кислотную группу, такую как функциональная карбоксильная группа, и основание. Подходящие основания включают, но не ограничиваются этим, гидроксиды щелочных металлов, таких как натрий, калий и литий; гидроксиды щелочноземельных металлов, таких как кальций и магний; гидроксиды других металлов, таких как алюминий и цинк; аммиак и органические амины, такие как незамещенные или гидрокси-замещенные моно-, ди- или триалкиламины, дициклогексиламин; трибутиламин; пиридин; N-метил, N-этиламин; диэтиламин; третиламин; моно-, бис- или трис-(2-ОН-низишие алкиламины), такие как моно-, бис- или трис-(2-гидроксиэтил)амин, 2-гидрокситертбутиламин или трис-(гидроксиметил)метиламин, N,N-ди-низишие алкил-N-(гидроксильный алкил)-амины, такие как N,N-диметил-N-(2-гидроксиэтил)мин или три-(2-гидроксиэтил)амин; N-метил-O-глюкамин; и аминокислоты, такие как аргинин, лизин и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе композиции находятся в форме фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, любой описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб можно вводить субъекту в качестве компонента композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Такие композиции могут, необязательно, содержать подходящее количество

фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества так, чтобы получить форму для надлежащего введения.

Фармацевтические вспомогательные вещества могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая вещества углеводородного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Фармацевтические вспомогательные вещества могут представлять собой, например, солевой раствор, аравийскую камедь, желатин, крахмальный клейстер, тальк, кератин, коллоидный диоксид кремния, мочевины и тому подобное. Кроме того, можно применять вспомогательные, стабилизирующие агенты, загустители, лубриканты и красители. В одном варианте реализации изобретения фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества являются стерильными при введении субъекту. Вода является удобным вспомогательным веществом, когда любой описанный в данном документе агент вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерола также можно применять в качестве жидких вспомогательных веществ, в частности, для инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерола, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерол, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Любой описанный в данном документе агент может, при необходимости, также содержать малые количества смачивающих или эмульсифицирующих агентов или pH-буферных агентов.

В настоящее изобретение включен описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназы, такой как сорафениб, который может находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, капель, таблеток, пилюль, пеллетов, капсул, капсул, содержащих жидкости, порошков, препаратов с длительным высвобождением, суппозиториях, эмульсий, аэрозолей, спреев, суспензий или в другой форме, подходящей для применения. В одном варианте реализации изобретения композиция находится в форме капсулы (см., например, патент США № 5698155). Другие примеры подходящих фармацевтических вспомогательных веществ описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995), включенной в данный документ посредством ссылки.

В случае необходимости CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназы, такой как сорафениб, также может содержать солибилизирующий агент. Также агенты можно доставлять при помощи подходящего средства или устройства для доставки, как известно в данной области техники. Виды комбинированной терапии, описанные в данном документе, можно доставлять совместно при помощи одного средства для доставки или устройства для доставки. Композиции, предназначенные для введения, могут, необязательно, содержать местный анестетик, такой как, например, лидокаин, чтобы уменьшить боль в месте инъекции.

Препараты, содержащие CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназы, такой как сорафениб) согласно настоящему изобретению, удобно предоставлять в единичной дозировочной форме и можно получать любыми способами, хорошо известными в области техники фармации. Такие способы в общем случае включают этап смешивания терапевтических агентов с носителем, который представляет собой один или более вспомогательных ингредиентов. Как правило, препараты готовят путем равномерного и тщательного смешивания терапевтического агента с жидким носителем, мелкоизмельченным твердым носителем или ними обоими, а затем, в случае необходимости, формования продукта в дозировочные формы необходимого препарата (например, путем влажного или сухого гранулирования, получения порошкообразных смесей, и т.д., с последующим таблетированием при помощи традиционных известных в данной области техники способов).

В одном варианте реализации изобретения любой описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназы, такой как сорафениб) готовят в соответствии с рутинными процедурами в виде композиции, подходящей для описанного в данном документе режима введения.

Пути введения включают, например: внутривенный, внутримышечный, внутривнутрибрюшинный, внутривнутрибрюшной, подкожный, интраназальный, эпидуральный, пероральный, подъязычный, интраназальный, интрацеребральный, интравагинальный, трансдермальный, ректальный, путем ингаляции или местно, в частности, в уши, нос, глаза или кожу. В некоторых вариантах реализации изобретения введение осуществляют перорально или путем парентеральной инъекции. Режим введения может быть оставлен на усмотрение лечащего врача и частично зависит от участка патологического состояния. В большинстве случаев введение приводит к высвобождению любого описанного в данном документе агента в кровоток.

Описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназы, такой как сорафениб) можно вводить перорально. Такой CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназы, например, сорафениб) также можно вводить любым удобным путем, например, путем внутривенной инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальную или кожно-слизистую оболочку (например, слизистую оболочку рта, слизистую

оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другим биологически активным агентом. Введение может быть системным или местным. Известно и может применяться для введения множество систем доставки, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, капсулы и т.д.

В конкретных вариантах реализации изобретения может существовать необходимость местного введения в участок, нуждающийся в лечении.

В одном варианте реализации изобретения описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) готовят в соответствии с рутинными процедурами в виде композиции, подходящей для перорального введения человеку. Композиции для пероральной доставки могут находиться, например, в форме таблеток, леденцов, водных или масляных суспензий, гранул, порошков, эмульсий, капсул, сиропов или эликсиров. Перорально вводимые композиции могут содержать один или более агентов, например, подсластителей, таких как фруктоза, аспартам или сахарин; ароматизаторов, таких как перечная мята, гаультериевое масло или вишня; красителей; и консервантов для получения фармацевтически привлекательного препарата. Кроме того, в случае таблеток или пилюль композиции могут иметь покрытие, чтобы замедлить распад и всасывание в желудочно-кишечном тракте, тем самым обеспечивая длительное действие в течение продолжительного периода времени. Избирательно проницаемые мембраны, окружающие осмотически активный описанный в данном документе CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб), также подходят для перорально вводимых композиций. В случае последней платформы жидкость из среды, окружающей капсулу, поглощается движущим соединением, который набухает и вытесняет агент или композицию, содержащую агент, через отверстие. Такие платформы для доставки могут обеспечивать профиль доставки преимущественно нулевого порядка в отличие от пикообразных профилей препаратов с мгновенным высвобождением. Также можно применять замедляющий препарат, такой как моностеарат глицерола или стеарат глицерола. Пероральные композиции могут содержать стандартные вспомогательные вещества, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза и карбонат магния. В одном варианте реализации изобретения вспомогательные вещества имеют фармацевтическую степень очистки. Суспензии, кроме активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксил алюминия, бентонит, агар-агар, трагакант и т.д., и их смеси.

Дозировочные формы, подходящие для парентерального введения (например, внутривенной, внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной и внутрисуставной инъекции и инфузии), включают, например, растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии и тому подобное. Также они могут производиться в форме стерильных твердофазных композиций (например, лиофилизированной композиции), которые можно растворять или суспендировать в стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением. Они могут содержать, например, суспендирующие или диспергирующие агенты, известные в данной области техники.

Дозировка описанного в данном документе CBL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб), а также схема дозирования может зависеть от различных параметров, включая, но не ограничиваясь этим, заболевание, лечение которого проводят, общее состояние здоровья субъекта и предписания лечащего врача по введению. Любой описанный в данном документе агент можно вводить нуждающемуся в этом субъекту до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения дополнительного терапевтического агента. В различных вариантах реализации изобретения любой описанный в данном документе агент вводят через 1 мин, через 10 мин, через 30 мин, менее чем через 1 ч, через 1 ч, через 1-2 ч, через 2-3 ч, через 3-4 ч, через 4-5 ч, через 5-6 ч, через 6-7 ч, через 7-8 ч, через 8-9 ч, через 9-10 ч, через 10-11 ч, через 11-12 ч, не более чем через 24 ч или не более чем через 48 ч.

Количество описанного в данном документе CBL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб), которое смешивают с материалом носителя для получения единичной дозировки, может варьироваться в зависимости от проходящего лечения субъекта и конкретного режима введения. Чтобы определить оптимальный диапазон дозировок можно использовать *in vitro* или *in vivo* методы анализа.

В общем случае применяемые дозы известны специалистам в данной области техники. Например, дозы можно определить в соответствии с Physicians' Desk Reference, 66th Edition, PDR Network; 2012 Edition (27 декабря 2011 г), содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения обеспечивается возможность получения пациентом доз, которые превышают определенные в соответствии с Physicians' Desk Reference, или доз, которые ниже утвержденного количества или МПД.

Дозировка описанного в данном документе CBL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) может зависеть от нескольких факторов, включая тяжесть патологического состояния, факт того, нуждается ли патологическое состояние в лечении или предотвращении, а также возраст, массу и состояние здоровья субъекта, лечение которого проводят. Кроме того, на применяемую дозировку может влиять фармакогенная (влияние генотипа на профиль фармакокинетики, фармакодинамики или эффективности терапевтического средства) информация в отношении конкретного субъекта. Кроме того, конкретные индивидуальные дозы можно корректировать в зависимости от различных факторов, включая конкретную комбинацию вводимых агентов, время введения, путь введения, природу препарата, скорость выведения, конкретное заболевание, лечение которого проводят, тяжесть нарушения и анатомическую локацию нарушения. Можно ожидать наличие некоторых вариаций в дозировке.

В некоторых вариантах реализации изобретения, в случае перорального введения млекопитающему, дозировка описанного в данном документе CBL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, например, сорафениб) может составлять от 0,001 мг/кг/день до 100 мг/кг/день, от 0,01 мг/кг/день до 50 мг/кг/день или от 0,1 мг/кг/день до 10 мг/кг/день. В случае перорального введения человеку дозировка любого описанного в данном документе агента обычно составляет от 0,001 мг до 1000 мг в день, от 1 мг до 600 мг в день или от 5 мг до 30 мг в день.

В некоторых вариантах реализации изобретения для введения описанного в данном документе CBL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) путем парентеральной инъекции дозировка может составлять от 0,1 мг до 250 мг в день, от 1 мг до 20 мг в день или от 3 мг до 5 мг в день. Инъекции можно делать до четырех раз в день. В общем случае при пероральном или парентеральном введении дозировка любого описанного в данном документе агента обычно составляет от 0,1 мг до 1500 мг в день или от 0,5 мг до 10 мг в день, или от 0,5 мг до 5 мг в день. Можно вводить дозировку до 3000 мг в день.

В другом варианте реализации изобретения доставку можно осуществлять в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat et al., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989).

CBL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) можно вводить при помощи средств для контролируемого высвобождения или продолжительного высвобождения, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры включают, но не ограничиваются этим, описанные в патентах США № 3845770; 3916899; 3536809; 3598123; 4008719; 5674533; 5059595; 5591767; 5120548; 5073543; 5639476; 5354556; и 5733556, каждый из которых в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Такие дозировочные формы можно применять, чтобы обеспечить контролируемое или продолжительное высвобождение одного или более активных ингредиентов, используя, например, гидропропилметилцеллюлозу, другие полимерные матрицы, гели, проницаемые мембраны, осмотические системы, многослойные покрытия, микрокапсулы, липосомы, микросферы или их комбинации в различных пропорциях, чтобы обеспечить необходимый профиль высвобождения. Подходящие препараты с контролируемым или продолжительным высвобождением, известные специалистам в данной области техники, включая описанные в данном документе, можно легко выбрать для применения с активными ингредиентами описанных в данном документе агентов. Таким образом, в изобретении предложены единичные дозировочные формы, подходящие для перорального введения, такие как, без ограничений, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы и капсуловидные таблетки, приспособленные для контролируемого или продолжительного высвобождения.

Контролируемое или продолжительное высвобождение активного ингредиента можно стимулировать различными условиями, включая, но не ограничиваясь этим, изменение pH, изменение температуры, стимуляцию подходящей длиной световой волны, концентрацию или доступность ферментов, концентрацию или доступность воды или другие физиологические условия или соединения.

В другом варианте реализации изобретения можно применять полимерные материалы (см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; см. также Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105).

В другом варианте реализации изобретения система контролируемого высвобождения может быть размещена вблизи предназначенной для лечения целевой области, и в таком случае необходима только часть системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Можно применять другие системы контролируемого высвобождения, обсуждаемые в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533).

Введение описанного в данном документе CBL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) можно независимо осуществлять от одного до четырех раз в день или от одного до четырех раз в месяц, или от од-

ного до шести раз в год, или раз в каждые два, три, четыре или пять лет. Продолжительность применения может составлять один день или один месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев, один год, два года, три года и может даже быть пожизненным для субъекта. Может быть предписано продолжительное, долгосрочное введение. Дозировку можно вводить в виде единичной дозы или делить на несколько доз. В общем случае необходимую дозировку следует вводить через установленные интервалы в течение длительного периода, обычно составляющего по меньшей мере несколько недель или месяцев, хотя могут требоваться более длительные периоды введения, составляющие несколько месяцев или лет, или даже более.

Режим дозирования с применением описанного в данном документе СВL0137 (и/или дополнительных агентов, таких как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) можно выбирать в соответствии с различными факторами, включая тип, вид, возраст, массу, пол и медицинское состояние субъекта; тяжесть патологического состояния, лечение которого проводят; путь введения; почечную и печеночную функцию субъекта; фармакогеномный профиль индивида; и конкретное применяемое соединение согласно изобретению. Описанный в данном документе СВL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) можно вводить в виде единичной дневной дозы или общую дневную дозу можно вводить в виде разделенных доз два, три или четыре раза в день. Кроме того, описанный в данном документе СВL0137 (и/или дополнительные агенты, такие как химиотерапевтические агенты, представляющие собой ингибитор киназ, такой как сорафениб) можно вводить скорее непрерывно, чем периодически в течение режима дозирования.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект и/или животное является млекопитающим, например, человеком, мышью, крысой, морской свинкой, собакой, кошкой, лошадью, коровой, свиньей, кроликом, овцой, отличным от человека приматом, таким как обезьяна, шимпанзе или бабуин. В других вариантах реализации изобретения субъект и/или животное не является млекопитающим, например, дахио. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект и/или животное может содержать флуоресцентно меченые клетки (например, ЗФБ). В некоторых вариантах реализации изобретения субъект и/или животное является трансгенным животным, содержащим флуоресцентную клетку.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект и/или животное является человеком. В некоторых вариантах реализации изобретения человек является ребенком. В других вариантах реализации изобретения человек является взрослым. В других вариантах реализации изобретения человек является пожилым человеком. В других вариантах реализации изобретения человек может называться пациентом.

В определенных вариантах реализации изобретения возраст человека соответствует диапазону от около 0 месяцев до около 6 месяцев, от около 6 до около 12 месяцев, от около 6 до около 18 месяцев, от около 18 до около 36 месяцев, от около 1 до около 5 лет, от около 5 до около 10 лет, от около 10 до около 15 лет, от около 15 до около 20 лет, от около 20 до около 25 лет, от около 25 до около 30 лет, от около 30 до около 35 лет, от около 35 до около 40 лет, от около 40 до около 45 лет, от около 45 до около 50 лет, от около 50 до около 55 лет, от около 55 до около 60 лет, от около 60 до около 65 лет, от около 65 до около 70 лет, от около 70 до около 75 лет, от около 75 до около 80 лет, от около 80 до около 85 лет, от около 85 до около 90 лет, от около 90 до около 95 лет или от около 95 до около 100 лет.

В других вариантах реализации изобретения субъект является отличным от человека животным и, следовательно, изобретение относится к ветеринарным применениям. В конкретном варианте реализации изобретения отличное от человека животное является домашним питомцем. В другом конкретном варианте реализации изобретения отличное от человека животное является сельскохозяйственным животным.

В изобретении предложены наборы, которые могут упростить введение любого описанного в данном документе агента. Типовой набор согласно изобретению содержит любую описанную в данном документе композицию в единичной дозировочной форме. В одном варианте реализации изобретения единичной дозировочной формой служит емкость, такая как предварительно наполненный шприц, который может быть стерильным и содержать любой описанный в данном документе агент и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или наполнитель. Набор может дополнительно содержать этикетку или распечатанные инструкции по применению любого описанного в данном документе агента. Также набор может содержать векорасширитель, местный анестетик и очищающий агент для места введения. Также набор может дополнительно содержать один или более дополнительных описанных в данном документе агентов. В одном варианте реализации изобретения набор содержит емкость, содержащую эффективное количество композиции согласно изобретению и эффективное количество другой композиции, такой как те, что описаны в данном документе. В одном варианте реализации изобретения набор содержит СВL0137 и химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназ, например, сорафениб, и/или химиотерапевтический агент, представляющий собой нуклеозидный аналог, например, гемцитабин.

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Материалы и методы

Животные: Для каждого исследования гепатоцеллюлярной карциномы (НСС) (HerG2, HerG2 (частичная доза CBL0137), Her3B и Her3B (частичная доза CBL0137) получали сорок самок бестимусных мышей и делили на группы обработки, состоящие из 10 животных на группу (2 клеток по 5 мышей в клетке). В случае исследования HerG2 (частичная доза CBL0137) обрабатываемая базовым раствором контрольная группа 1 состояла из 9 животных (1 клетка с 5 мышами и 1 клетка с 4 мышами). Для каждого исследования рака поджелудочной железы в LAR (совместный ресурс лабораторных животных) Онкологического института Розуэлла Парка получали пятьдесят самок мышей ТКИН и делили на группы обработки, состоящие из 5 животных (размещаемых в одной клетке) на группу. Для каждого исследования ксенографтного немелкоклеточного рака легкого H1975 получали семьдесят и шестьдесят самок бестимусных мышей и делили на группы обработки, состоящие из 10 животных на группу (2 клеток по 5 мышей в клетке).

Опухоли: образцы опухоли HerG2 НСС были получены от Technical Staff of Animal Group, BBL (80 образцов). Образцы опухоли Her3B НСС были получены от Technical Staff of Animal Research Core, BBL (80 образцов). Образцы опухолей PDA №13590 и №13756 были получены от Technical Staff of Animal Research Core, BBL (100 образцов). Опухолевые клетки H1975 и A549 NSCLC были получены от Technical Staff of BBL (8-9 мл при 5×10^7 клеток/мл).

Описание исследуемого материала HerG2: образцы 2 мм×2 мм ненекротических опухолей HerG2 (опухоли 2 пассажа, ~600-700 мм³ на момент сбора (HerG2-исследование); опухоли 1 пассажа, ~500-900 мм³ на момент сбора (HerG2-исследование (частичная доза CBL0137)), выращенные в организме бестимусных мышей, изначально полученные из клеток человеческой гепатоцеллюлярной карциномы HerG2 (ATCC).

Описание исследуемого материала Her3B: образцы 2 мм×2 мм ненекротических опухолей Her3B (опухоли 1 пассажа, ~600-700 мм³ на момент сбора (Her3B-исследование); опухоли 9 пассажа, ~800 мм³ на момент сбора (Her3B-исследование (частичная доза CBL0137)), выращенные в организме бестимусных мышей, изначально полученные из клеток человеческой гепатоцеллюлярной карциномы Her3B (ATCC).

Описание исследуемого материала PDA: образцы 2 мм×2 мм полученных от пациентов ненекротических опухолей PDA №13590 или №13756 (опухоли 6 пассажа, ~600-700 мм³ на момент сбора), выращенные в организме мышей ТКИН.

Описание исследуемого материала H1975 NSCLS: Суспензию человеческой клеточной линии H1975 NSCLC (изначально полученной от ATCC) смешивали 1:1 с матригелем при 5×10^7 клеток/мл (5×10^6 клеток, доставляемых посредством 100 мкл инъекции) и выдерживали на льду до инокуляции.

Все образцы опухолей были свежесобранными, обработанными в асептических условиях в боксе микробиологической безопасности и помещены в стерильную среду RPMI+10 % PBS или D-PBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко) перед имплантацией мышам. Образцы имплантировали непосредственно после сбора.

Реагенты и лекарственные препараты: каптизол, предоставляемый Cydex (№ в каталоге - Captisol; партия - NC-04A-05033; и условия хранения - 2-5°C); D-PBS без хлорида кальция или хлорида магния, 1X, предоставляемый Media Core, Cleveland Clinic Foundation (CCF) (№ в каталоге - 121-500р и условия хранения - 2-5°C, хранить на льду во время использования); CBL0137, предоставляемый Aptuit (№ в каталоге -CBL0137; партия - 10-106-88-30; и условия хранения - комнатная температура, в осушителе); гемцитабин, хлористоводородная соль, предоставляемый LC Laboratories (№ в каталоге - G-4177; партия - GMC-103; и условия хранения - -20°C); сорафениб, предоставляемый LC Laboratories (№ в каталоге - S-8502; партия - BSF-105; и условия хранения - -20°C); RPMI1640 предоставляемая Media Core, CCF (№ в каталоге - CCF, 12-500р и условия хранения - 4°C, хранить на льду во время использования); fetalная бычья сыворотка (ФБС), предоставляемая Atlanta Biologicals (№ в каталоге -S11050; партия - A1031; условия хранения - -20°C); хлорид натрия (NaCl, 0,9% для инъекций), предоставляемый Baxter Healthcare Corp. или Hospira, Inc. (партия - P220525 (Baxter) или 64-106-JT (Hospira) и условия хранения - комнатная температура); матригель, предоставляемый Fisher Scientific (№ в каталоге - CB354248 (BD 12483); партия - 37399; и условия хранения - -20°C); и диметилсульфоксид (ДМСО), предоставляемый Sigma-Aldrich (№ в каталоге - 34869-100 мл; партия -SHBV7695V; и условия хранения - комнатная температура).

Приготовление лекарственных препаратов и реагентов: Растворы для дозирования готовили в четырех партиях для исследований НСС и PDA (по одной на каждую неделю стадии обработки в исследовании), чтобы гарантировать, что в течение исследования использовались свежие растворы. Каждый раз во время приготовления раствора в HerG2-исследовании, 35 мл сорафениба в концентрации 1,9 мг/мл разводили в 5% ДМСО-200мг/мл каптизола, а 12 мл CBL0137 в концентрации 8,8 мг/мл разводили в 100 мг/мл каптизола. Все растворы для дозирования лекарственных препаратов и контрольные базовые растворы (100 мг/мл каптизола и 5% ДМСО-200 мг/мл каптизола) стерилизовали посредством фильтрации.

Для HerG2-исследования (частичная доза CBL0137) 36 мл сорафениба в концентрации 3,75 мг/мл

разводили в 5 % ДМСО-200мг/мл каптизола, а 13 мл CBL0137 в концентрации 7,5 мг/мл разводили в 100 мг/мл каптизола. Растворы для вв введения (растворы для дозирования CBL0137 и 100 мг/мл базового контрольного раствора каптизола) стерилизовали посредством фильтрации.

Для Нер3В-исследования 34,2 мл сорафениба в концентрации 3,75 мг/мл разводили в 5% ДМСО-200 мг/мл каптизола, а 14 мл CBL0137 в концентрации 7,5 мг/мл разводили в 100 мг/мл каптизола. Растворы для вв введения (растворы для дозирования CBL0137 и 100 мг/мл базового контрольного раствора каптизола) стерилизовали посредством фильтрации.

Для Нер3В-исследования (частичная доза CBL0137) растворы для дозирования готовили в двух партиях (по одной на каждые две недели стадии обработки в исследовании). В течение первых двух недель дозирования 14 мл CBL0137 в концентрации 6,25 мг/мл разводили в 100 мг/мл каптизола, а 68,4 мл сорафениба в концентрации 3,75 мг/мл разводили в 5% ДМСО-200 мг/мл каптизола. В течение последних двух недель дозирования 14 мл CBL0137 в концентрации 6,25 мг/мл разводили в 100 мг/мл каптизола, а 68,4 мл сорафениба в концентрации 3,75 мг/мл разводили в 5% ДМСО-200 мг/мл каптизола.

Для PDA-исследований растворы гемцитабина и CBL0137 готовили следующим образом: 12 мл гемцитабина в концентрации 5,0 мг/мл разводили в воде Milli-Q, а 7 мл CBL0137 в концентрации 10,0 мг/мл разводили в 150 мг/мл каптизола и стерилизовали посредством фильтрации.

Все приготовленные выше растворы хранили при 4°C в течение недели их использования.

Для NSCLC-исследований растворы готовили в двух партиях (по одной на 2 недели), чтобы гарантировать, что в течение исследования использовались свежие растворы. Для H1975 NSCLC-исследования 1 растворы находились в двух пробирках по 10 мл каждая с концентрацией 4,4 мг/мл и 8,8 мг/мл CBL0137 в 100 мг/мл каптизола и двух пробирках по 10 мл каждая с концентрацией 5,0 мг/мл и 2,5 мг/мл гемцитабина в стерильной воде. Для H1975 NSCLC-исследования 2 растворы находились в одной пробирке на 16 мл с концентрацией 11,25 мг/мл CBL0137 в 150 мг/мл каптизола и двух пробирках по 25 мл каждая с концентрацией 1,0 мг/мл гемцитабина в стерильной воде.

Приготовление и подкожная имплантация образцов опухолей: опухоли НерG2 (пассаж 2 для НерG2-исследования и пассаж 1 для НерG2-исследования (частичная доза CLB0137)) или опухоли Нер3В (пассаж 1 для Нер3В-исследования и пассаж 9 для Нер3В-исследования (частичная доза CLB0137)) выращивали в бестимусных мышцах и вырезали у умерщвленных мышей после достижения ~500-900 мм³. Опухоли PDA (пассаж 6) выращивали в мышцах ТКИН (оба бока) и вырезали у умерщвленных мышей после достижения размера ~600-700 мм³. Вырезанные опухоли переносили в стерильную чашку Петри, содержащую среду RPMI+10% PBS или D-PBS плюс пенициллин/стрептомицин. Добавляли достаточно среды для заливки опухоли, чтобы гарантировать жизнеспособность материала трансплантата. Опухоли разрезали стерильным скальпелем на 2×2 мм кубики. Образцы старались сделать насколько это возможно одинаковыми по размеру и форме. Образцы опухолей имплантировали мышам-реципиентам непосредственно после приготовления.

Приготовление и инокуляция опухолевых клеток: в ночь перед инокуляцией матригель помещали на лед в холодильнике для размораживания. Перед началом сбора клеток запас пипеток, пробирок и наконечников помещали в морозильную камеру, чтобы они были холодными во время работы с матригелем. Шприцы на один мл и иглы 1/2" 23G также предварительно охлаждали. Этот этап был необходим для предотвращения преждевременного отверждения матригеля, который отвердевает при комнатной температуре или выше (т.е. 37°C).

Клеточную суспензию H1975 готовили непосредственно перед инокуляцией опухолей в ФСБ. Клетки H1975 из 16 пассажа собирали из сорока чашек по 150 мм в диаметре и разводили до 10×10⁷ клеток/мл в ФСБ (5,87 мл). Непосредственно перед инокуляцией при помощи предварительно охлажденных наконечников и пробирок смешивали 4,5 мл этой клеточной суспензии с эквивалентным объемом матригеля (1:1) до общего объема 9 мл. Клеточные суспензии хранили на льду. Конечная концентрация клеток составляла 5×10⁷ клеток/мл.

Перед инокуляцией мышей смесь опухолевых клеток и матригеля тщательно перемешивали, по несколько раз переворачивая пробирки. Предварительно охлажденный 1 мл шприц заполняли смесью опухолевых клеток и матригеля, а затем к концу шприца присоединяли предварительно охлажденную закрытую иглу 1/2" 23G, чтобы провести инъекцию. Закрытый наполненный шприц несколько раз переворачивали, после чего 100 мкл смеси опухолевых клеток и матригеля подкожно инокулировали в левый бок каждой мыши.

Для инокуляции мышей анестезировали изофураном (3-4% индукции в 100% O₂, 1-2% поддержание), чтобы способствовать надлежащей подкожной инокуляции.

Измерения размера опухолей: Размер опухоли измеряли при помощи цифрового калипера в двух измерениях (в мм): максимальная длина (l) и максимальная ширина (w), взятые перпендикулярно по отношению друг к другу. Результаты измерений использовали для расчета объема опухоли по формуле:

$$\text{объем опухоли} = (l \times w^2) / 2 \quad (w < 1).$$

Величина, полученная по этой формуле, также эквивалентна массе опухоли в мг. Начиная со 2 дня после имплантации опухоли, измерения опухолей проводили каждые 2-3 дня до начала обработки, а за-

тем - дважды в неделю (например, на 1 день (D1, день начала обработки), D4, D8, D11, D15, D18, D22, D25, D29, D32, D36, D39, D43, D46, D50, D53 и D57). Измерения опухолей проводили чаще, когда размер опухоли достигал размера, соответствующего конечной точке, чтобы не пропустить конечную точку между запланированными измерениями.

Введение исследуемого и контрольного препаратов: Мышам вводили указанные растворы, когда средний объем опухоли на группу обработки составлял $\sim 45\text{--}200\text{ мм}^3$.

Мышей из HerG2-исследования обрабатывали CBL0137 и/или сорафенибом в соответствии со следующими схемами: 1) базовый раствор; 2) 15 мг/кг сорафениба перорально (по) ежедневно; 3) 70 мг/кг CBL0137 внутривенно (вв) на каждый 4-й день (Q4d); или 4) 70 мг/кг CBL0137 вв Q4d +15 мг/кг сорафениба по ежедневно. Мышей из HerG2-исследования (частичная доза CBL0137) обрабатывали: 1) контрольным базовым раствором; 2) 30 мг/кг сорафениба перорально (по) ежедневно; 3) 60 мг/кг CBL0137 внутривенно на каждый 4-й день (Q4d); или 4) 60 мг/кг CBL0137 вв Q4d+30 мг/кг сорафениба по ежедневно. Мышей из Her3B-исследования обрабатывали: 1) базовым раствором, 2) 30 мг/кг сорафениба по ежедневно, 3) 60 мг/кг CBL0137 вв Q4d или 4) 60 мг/кг CBL0137 вв Q4d+30 мг/кг сорафениба по ежедневно. Мышей из Her3B-исследования (частичная доза CBL0137) обрабатывали: 1) базовым раствором; 2) 30 мг/кг сорафениба перорально (по) ежедневно; 3) 50 мг/кг CBL0137 внутривенно на каждый 4-й день (Q4d); или 4) 50 мг/кг CBL0137 вв Q4d+30 мг/кг сорафениба по ежедневно. Группу отрицательного контроля (группа 1) обрабатывали в течение 4 недель комбинацией базовых растворов, применяемых для доставки CBL0137 (100 мг/мл каптизола) и сорафениба (5% ДМСО-200мг/мл каптизола), используя те же способ и схему доставки, что и для соответствующего лекарственного препарата. Q4d-дозирование CBL0137 проводили на D1, D5, D9, D13, D17, D21, D25 и D29 исследования, а ежедневное дозирование сорафенибом проводили на D1-D28. Для групп, которые получали только один лекарственный препарат (CBL0137 или сорафениб), а не два, базовый раствор для неиспользуемого лекарственного препарата вводили вместо него в качестве имитации введения, используя соответствующие способ и схему доставки. Объем вводимого перорально или внутривенно раствора для дозирования составлял 8 мл/кг массы тела. Внутривенные инъекции проводили через хвостовую вену. Введение лекарственных препаратов осуществляли медленно, не надавливая сильно на шприц.

Мышей их PDA-исследования обрабатывали CBL0137 и/или гемцитабином в соответствии со следующими схемами: 1) базовым раствором, 2) 40 мг/кг сорафениба по ежедневно, 3) 90 мг/кг CBL0137 вв Q4d или 4) 40 мг/кг CBL0137 вв Q4d+30 мг/кг сорафениба по ежедневно. Мышей из исследования PDA №13756 обрабатывали CBL0137 и/или гемцитабином в соответствии со следующими схемами: 1) базовый раствор; 2) 40 мг/кг гемцитабина вв Q4d в течение 4 недель; 3) 80 мг/кг CBL0137 вв 1×/нд в течение 4 недель; или 4) 40 мг/кг гемцитабина вв Q4d в течение 4 недель+80 мг/кг CBL0137 вв 1×/нд в течение 4 недель. Q4d-дозирование гемцитабином проводили на D1, D5, D9, D13, D17, D21, D25 и D29 исследования, а 1×/нд дозирование CBL0137 проводили на D1, D8, D15 и D22. Группу отрицательного контроля (группа 1) обрабатывали в течение 4 недель комбинацией базовых растворов, применяемых для доставки гемцитабина (стерильная вода MilliQ) и CBL0137 (150 мг/мл каптизола), используя те же способ и схему доставки, что и для соответствующего лекарственного препарата. Объем вводимого вв или вв раствора для дозирования составлял 8 мл/кг массы тела мыши. Внутривенные инъекции проводили через хвостовую вену. Введение лекарственных препаратов осуществляли медленно, не надавливая сильно на шприц.

Мышей из NSCLC-исследования 1 обрабатывали CBL0137 и/или гемцитабином в соответствии со следующими схемами: 1) базовый раствор; 2) 70 мг/кг CBL0137 вв Q4d; 3) 40 мг/кг гемцитабина вв Q4d; или 4) 70 мг/кг CBL0137 вв Q4d+40 мг/кг гемцитабина вв Q4d. Мышей из NSCLC-исследования 2 обрабатывали CBL0137 и/или гемцитабином в соответствии со следующими схемами: 1) базовый раствор; 2) 90 мг/кг CBL0137 вв 1/нд в течение 4 недель; 3) 20 мг/кг гемцитабина вв Q4d в течение 4 недель; или 4) 90 мг/кг CBL0137 вв 1/нд в течение 4 недель+20 мг/кг гемцитабина вв Q4d в течение 4 недель. Для всех групп Q4d-дозирование проводили на D1, D5, D9, D13, D17, D21, D25 и D29 исследования. Для групп, которые получали только один лекарственный препарат, а не два, базовый раствор для неиспользуемого лекарственного препарата вводили вместо него в качестве имитации введения. Объем вводимого вв или вв раствора для дозирования составлял 8 мл/кг массы тела мыши. Внутривенные инъекции проводили через хвостовую вену. Введение лекарственных препаратов осуществляли медленно, не надавливая сильно на шприц.

Мониторинг и сбор образцов: Дважды в неделю проводили осмотр мышей в отношении смертности и заболеваемости в течение эксперимента. В частности, проводили осмотр мышей в отношении изменений кожи, меха, двигательной активности и основных общих характеристик поведения. Все аномальные наблюдения документировали и приписывали полуколичественные оценки "состоянию организма", "позе" и "активности". Оценки 4, 3, 2 и 1 приписывали нормальному состоянию (4), и немного (3), умеренно (2) и сильно (1) аномальному состоянию, соответственно. Клетки помещали в бокс с ламинарным потоком воздуха и открывали, чтобы однозначно оценить активность мышей. Если мыши демонстрировали явные признаки токсичности (например, нахохливание, съеживание, низкую активность, потерю >15%

массы), для этой мышцы приостанавливали обработку до ее полного восстановления (т.е. восстановления массы в пределах 10% от начальной массы).

Анализ данных: Для всех исследуемых групп максимальное ингибирование роста опухоли рассчитывали для 11, 13 или 15 дня (день X). Эта временная точка соответствовала самой поздней временной точке, для которой наблюдалось достаточное число опухолей во всех группах сравнения для проведения статистического анализа. Для каждой опухоли рассчитывали относительный размер опухоли относительно ее размера на 1 день, когда была начата обработка (т.е. кратность роста опухоли). Чтобы рассчитать максимальное ингибирование роста опухоли для каждой опухоли, использовали следующее уравнение:

$$100 - (\text{кратность роста опухоли для обработки лекарственным препаратом на день X} / \text{средняя кратность роста опухоли для обработки базовым раствором на день X}) \times 100.$$

Разницу в размере опухолей между группами определяли, используя анализ ANOVA (программное обеспечение GraphPad Prism 5), где "*" относится к $P=0,01-0,05$ (значимый), "***" относится к $P=0,001-0,01$ (высокозначимый), а "****" относится к $P<0,001$ (исключительно высокозначимый). Разницы, которые не являются статистически значимыми, обозначены "нз". Время удвоения размера опухоли (dT) невозможно рассчитать для этого исследования, так как для групп 3 и 4 во время стадии обработки данного исследования не наблюдали удвоения размера опухолей. Замедление роста опухоли (T-C) рассчитывали, вычитая медианное время для контроля, необходимое для достижения конечной точки, соответствующей размеру 1000 мм³, из медианного времени, необходимого для обрабатываемых групп для достижения размера, соответствующего конечной точке. В отношении расчета "времени, необходимого для достижения [размера опухоли], соответствующего конечной точке, следует отметить, что некоторые опухоли в каждой группе вообще не росли во время исследования. Так как эти опухоли однозначно не могли достичь конечной точки вне зависимости от времени, они были исключены из расчета "времени, необходимого для достижения конечной точки". При этом эти опухоли не были исключены из какого-либо другого анализа, так как они встречались с приблизительно одинаковой частотой во всех группах. T/C % рассчитывали следующим образом:

$$(\text{T день X} - \text{T день 1}) / (\text{C день X} - \text{C день 1}) \times 100,$$

где T представляет медианный объем опухолей среди обрабатываемых опухолей, а C представляет собой медианный объем опухолей среди контрольных опухолей в указанные дни. Эта величина представляет размер обрабатываемой опухоли относительно контрольной опухоли. Таким образом, T/C %=40 означает, что размер обрабатываемой опухоли составляет 40% от размера контрольной опухоли для указанной временной точки. Разницу в медианном времени выживания между исследуемыми группами анализировали, используя логарифмический ранговый критерий (программное обеспечение GraphPad Prism 5).

Пример 1. Оценка обработки комбинацией CBL0137-сорафениб против ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы Hep2G или Hep3B.

Кинетика смертности для HepG2-исследования представлена на фиг. 1, панель А. Не было никаких признаков какого-либо существенного влияния токсичности обработки на смертность животных в этом исследовании. Обработка лекарственными препаратами не являлась причиной более ранней смертности и не сказывалась негативно на МВВ (медианном времени выживания) по сравнению с обработкой базовым раствором. Разница в кинетике смертности и итоговой выживаемости в этом исследовании отражали, главным образом, эффективность обработки, но не токсичность. Аналогично, такие же результаты наблюдали для HepG2-исследования (частичная доза CBL0137), Hep3B-исследования и Hep3B-исследования (частичная доза CBL0137), как представлено на фиг. 1, панель В; фиг. 2, панель А; и фиг. 2, панель В, соответственно.

Анализ кинетики выживаемости для несущих опухоль HepG2 мышей (фиг. 1, панель А) показал, что наблюдаемое в обрабатываемой базовым раствором группе 1 МВВ, составляющее 15 дней, не менялось при обработке только сорафенибом (группа 2, МВВ=15 дней), но возрастало до 54,0 и 52,5 дней, соответственно, при обработке только CBL0137 или CBL0137+сорафенибом. Эта разница в МВВ отражает влияние применяемой обработки на рост опухоли, так как смертность в этом исследовании, за исключением одной мыши, была связана с параметрами, связанными с опухолями, но не с токсичностью обработки (см. выше).

Анализ кинетики выживаемости для несущих опухоль HepG2 (частичная доза CBL0137) мышей (фиг. 1, панель В) показал, что МВВ возрастало от 13 дней, наблюдаемых в обрабатываемой базовым раствором группе 1, до 27,5 дней, 23 дней и 38,5 дней в обрабатываемых лекарственными препаратами группах 2, 3 и 4, соответственно. Кроме того, МВВ в комбинированно обрабатываемой группе 4 было большим, чем в любой из групп монотерапии ($P=0,0204$ для комбинации по сравнению с одним сорафенибом и $P=0,0001$ для комбинации по сравнению с одним CBL0137). Разница между обрабатываемыми одним лекарственным препаратом группами 2 и 3 была не значительной ($P=0,373$).

Анализ кинетики выживаемости для несущих опухоль Hep3B мышей (фиг. 2, панель А) показал, что медианное время выживания (МВВ), составляющее 11 дней и наблюдаемое в обрабатываемой базовым

вым раствором группе 1, возрастало ($P < 0,0001$) для всех исследуемых обработок лекарственными препаратами. Соответственно, МВВ возрастало до 25 дней при обработке сорафенибом, до 36 дней при обработке CBL0137 и до 39,5 дней при обработке CBL0137+сорафенибом. Хотя эти величины МВВ отображают разницу в других параметрах роста опухолей среди трех разных обрабатываемых лекарственными препаратами групп, различия в МВВ между обрабатываемыми лекарственными препаратами группами не были разными. Длительность выживания животных в этом исследовании отображала, главным образом, кинетику роста опухоли до размера, соответствующего конечной точке, а не развитие токсичности, связанной с обработкой.

Ту же тенденцию наблюдали для разницы в кинетике выживаемости мышей, несущих опухоль Her3В (частичная доза CBL0137) (фиг. 2, панель В). Медианное время выживания (МВВ) обрабатываемых базовым раствором мышей составляло 14,5 дней по сравнению с 21,5, 17,5 и 28 днями в группах, обрабатываемых сорафенибом, CBL0137 и CBL0137+сорафенибом, соответственно. Логарифмический ранговый анализ по сравнению с обрабатываемой базовым раствором группе показал, что наблюдаемое увеличение времени выживания было статистически значимым для обрабатываемой CBL0137+сорафенибом группе ($P=0,0092$), а также для группы монотерапии сорафенибом ($P=0,013$), но не для группы монотерапии CBL0137 ($P=0,2688$). Эта разница в МВВ отображает влияние обработки лекарственным препаратом на рост опухоли, так как, опять, смертность в этом исследовании была связана, главным образом, с параметрами, связанными с опухолями, но не с токсичностью обработки.

После этого определяли противоопухолевую эффективность исследуемых схем обработки путем измерения опухолей в течение курса исследования при помощи цифровых калиперов.

Кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе (представленная средней кратностью изменения объема опухоли на группу в разные дни в течение курса обработки по сравнению с начальным объемом) приведена на фиг. 3 (панели А и В) и фиг. 4 (панели А и В). Для HerG2-исследования (фиг. 3, панель А), для анализа средней кратности роста опухолей был выбран 15 день, так как он был наиболее поздней временной точкой, для которой было достаточно данных по всем группам для такого анализа. В этот день среднее изменение объема опухоли по сравнению с 1 днем соответствовало 9,0-кратному превышению в группе 1 (базовый раствор), 8,4-кратному в группе 2 (только сорафениб), 0,5-кратному в группе 3 (только CBL0137) и 0,9 в группе 4 (CBL0137+сорафениб). Средняя кратность роста опухоли была ниже в группе 3 и группе 4, чем в любой из группы 1 и группы 2, но между самими группами 3 и 4 разницы не было. Эти данные по средней кратности роста опухоли свидетельствуют о том, что опухоли в группах 3 и 4 не росли, а, наоборот, регрессировали в течение первых 15 дней исследования. В соответствии с этим наблюдением величины Т/С % в обеих группах обработки CBL0137 (группы 3 и 4) были отрицательными (-3,5% и -3,3%, соответственно), тогда как величина Т/С %, составляющая 72,6% в группе 2, иллюстрирует минимальный эффект монотерапии сорафенибом. В том, что касается отдельных опухолей, 14 из 16 опухолей, которые росли в обрабатываемой CBL0137 Группе 3, и 13 из 16в обрабатываемой CBL0137+сорафенибом группе 4, демонстрировали некоторую степень регрессии во время курса обработки. В противоположность этому, 0/16 и 0/14 опухолей, которые росли в обрабатываемой базовым раствором группе 1 и обрабатываемой сорафенибом группе 2, соответственно, демонстрировали сходное поведение. Однако большинство регрессирующих опухолей начало расти через ~2 недели после окончания стадии обработки в исследовании, а общая (средняя по группе) кинетика и степень роста опухолей в течение этого периода были сходными для групп 3 и 4 (фиг. 3, панель А).

В том, что касается кинетики роста опухолей, в HerG2-исследовании невозможно было рассчитать время удвоения объема опухоли (dT), потому что во время стадии обработки исследования для групп 3 и 4 удвоения объема опухолей не наблюдали, а наоборот, наблюдали регрессию опухолей. Замедление роста опухоли (Т-С) на основании медианного времени, необходимого для достижения размера опухоли, соответствующего конечной точке, для обрабатываемых (Т) и контрольных (С) групп составляло 5,65 дней в случае обработки сорафенибом по сравнению с 39,4 и 39,8 днями в случае обработки CBL0137 или CBL0137+сорафенибом, соответственно. Для этих расчетов любые опухоли, которые вообще не росли в течение курса исследования (4/20, 6/20, 4/20 и 4/20 для групп 1-4, соответственно), были исключены, так как понятно, что они не могли достичь конечной точки. При этом следует отметить, что нерастущие опухоли не были исключены из какого-либо другого анализа, так как они встречались с приблизительно одинаковой частотой во всех группах. Одна дополнительная опухоль в обрабатываемой базовым раствором контрольной группе 1 (клетка 2, мышь 4) была исключена только из расчета средней кратности роста опухоли на 15 день (и соответствующего % ингибирования роста на 15 день), так как она не достигла измеряемого размера к началу обработки и, следовательно, для нее не было проведено сравнительного измерения, чтобы точно оценить кратность роста и уровень ингибирования.

Кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для HerG2-исследования (частичная доза CBL0137) показана на фиг. 3, панель В. Для анализа средней кратности роста опухолей был выбран 13 день, так как он был наиболее поздней временной точкой, для которой было достаточно данных по всем группам для такого анализа. В этот день среднее изменение объема опухоли по сравнению с 1 днем составляло 13,2 раз в группе 1 (базовый раствор), 3,2 раз в группе 2 (только сорафениб), 3,5 раз в группе 3 (только CBL0137) и 1,6 в группе 4 (CBL0137+сорафениб). Таким образом, рост опухолей между 1 и 13

днями ингибировался на 76% в группе 2, 74% в группе 3 и 88% в группе 4.

Средняя кратность роста опухолей была ниже во всех трех обрабатываемых лекарственными препаратами группах (группы 3, 4 и 5), чем в обрабатываемой базовым раствором группе 1. Разница в средней кратности роста опухолей между обрабатываемыми лекарственными препаратами группами не была статистически значимой на 13 день, так как опухоли только начали расти. В более поздние временные точки (например, 23 день) разница в росте опухолей была более очевидной, а в группах 2-4 было достаточно выживших мышей для анализа. На 23 день средняя кратность роста опухолей составляла 6,02 раз и 6,26 раз в обрабатываемой сорафенибом группе 2 и обрабатываемой CBL0137 Группе 3, соответственно, по сравнению с 2,11 разами в комбинированно обрабатываемой группе 4. Разница в средней кратности роста опухолей на 23 день между группами монотерапии не была значимой ($P=0,979$), в то время как между комбинированной группой и любой группой монотерапии она была значимой ($P=0,0017$ в случае сравнения комбинации и только сорафениба и $P=0,0038$ в случае сравнения комбинации и только CBL0137).

Эффективность CBL0137 и сорафениба (и даже в больше степени, CBL0137+сорафениб) в подавлении роста опухолей также была проиллюстрирована величинами T/C %, рассчитанными на 13 день. Эти величины указывают на то, что размер опухолей в группах 2, 3 и 4 составлял 27,3%, 10,2% и 4,3%, соответственно, от размера опухолей в обрабатываемой базовым раствором группе 1.

В том, что касается кинетики роста опухолей, в HerG2-исследовании (частичная доза CBL0137) невозможно было рассчитать время удвоения объема опухоли (dT), потому что опухоли в комбинированно обрабатываемой группе 4 не начинали расти до завершения стадии обработки исследования. Замедление роста опухоли (T-C) на основании медианного времени, необходимого для достижения размера опухоли, соответствующего конечной точке, для обрабатываемых (T) и контрольных (C) групп составляло 17 дней в случае обработки сорафенибом, 10 дней в случае обработки CBL0137 и 29 дней в случае обработки CBL0137+сорафенибом. Для этих расчетов медианное время, необходимое для достижения размера опухоли, соответствующего конечной точке, в каждой группе (12,6, 29,6, 22,5 и 41,6 дней в группах 1-4, соответственно) определяли посредством экстраполяции из экспоненциальных кривых роста. Увеличение медианного времени, необходимого для достижения конечной точки, было статистически значимым для всех трех обрабатываемых лекарственными препаратами групп по сравнению с обрабатываемой базовым раствором группой 1. Среди обрабатываемых лекарственными препаратами групп медианное время, необходимое для достижения конечной точки, было большим в группе монотерапии сорафенибом по сравнению с группой монотерапии CBL0137 ($P=0,015$); при этом медианное время, необходимое для достижения конечной точки, было даже большим в комбинированно обрабатываемой группе ($P=0,001$ для комбинации по сравнению только с сорафенибом и $P<0,0001$ для комбинации по сравнению только с CBL0137).

Кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для Her3B-исследования показана на фиг. 4, панель A. Для анализа средней кратности роста опухолей был выбран 11 день, так как он был наиболее поздней временной точкой, для которой было достаточно данных по всем группам для такого анализа. В этот день среднее изменение объема опухоли по сравнению с 1 днем составляло 9,08 раз в группе 1 (базовый раствор) по сравнению с 2,98 разами в группе 2 (только сорафениб), 1,05 раз в группе 3 (только CBL0137) и 1,35 в группе 4 (CBL0137+сорафениб). Таким образом, рост опухолей на 11 день ингибировался на 67,2% в группе 2, 88,4% в группе 3 и 85,1% в группе 4. Средняя кратность роста опухолей была ниже во всех трех обрабатываемых лекарственными препаратами группах (группы 3, 4 и 5), чем в обрабатываемой базовым раствором группе 1 ($P<0,0001$ для каждой пары сравнения с группой 1). Разница в средней кратности роста опухолей между обрабатываемыми лекарственными препаратами группами не была статистически значимой на 11 день, так как опухоли не успели значительно вырасти (в группе 2) или вообще не росли (в группах 3 и 4) до этой временной точки. Для наиболее поздней временной точки, когда во всех трех обрабатываемых лекарственными препаратами группах было достаточное количество выживших мышей для статистического анализа (т.е. 25 день), разница в росте опухолей была более очевидной: средняя кратность роста опухолей составляла 8,22 раз в обрабатываемой сорафенибом группе 2, 3,03 раз в обрабатываемой CBL0137 группе 3 и 2,21 раз в комбинированно обрабатываемой группе 4. Следовательно, в среднем опухоли в группе монотерапии сорафенибом демонстрировали больший рост на 25 день, чем в группе монотерапии CBL0137 ($P=0,014$) или в комбинированной группе ($P=0,008$). В противоположность этому, средняя кратность роста опухолей на 25 день не отличалась для группы монотерапии CBL0137 и комбинированной группы ($P=0,898$).

Эффективность сорафениба и, даже в больше степени, CBL0137 и CBL0137+сорафениб в подавлении роста опухолей также была проиллюстрирована величинами T/C %, рассчитанными на 11 день. Эти величины указывают на то, что размер опухолей в группах 2, 3 и 4 составлял 33,4%, -6,4% и 2,5%, соответственно, от размера опухолей в обрабатываемой базовым раствором группе 1. Отрицательное значение T/C % для обрабатываемой CBL0137 группы 3 указывает на то, что в действительности в этой группе на 11 день опухоли уменьшились в размере (регрессировали).

В том, что касается кинетики роста опухолей, в Her3B-исследовании невозможно было рассчитать время удвоения объема опухоли (dT), время, необходимое для достижения размера опухоли, соответст-

вующего конечной точке, и замедление роста опухоли (Т-С), потому что опухоли в обрабатываемой CBL0137 группе 3 и обрабатываемой CBL0137+сорафенибом группе 4 не демонстрировали значительный рост (и во многих случаях в действительности регрессировали, см. ниже) во время стадии обработки исследования.

Хотя величины средней кратности роста опухолей на 11 и 25 дни указывают на небольшую степень роста опухолей в обрабатываемой CBL0137 группе 3 и комбинированно обрабатываемой группе 4 (<3 раз), многие отдельные опухоли в этих группах не росли, а, наоборот, регрессировали (объем опухолей был меньшим, чем в начале обработки на 1 день) во время стадии обработки исследования. Регрессию до 80 % или менее от стартового объема наблюдали в какой-то момент во время периода обработки для $^{11}/_{20}$ опухолей в группе 3 и для $^{8}/_{19}$ опухолей в группе 4. Для всех этих опухолей регрессию не наблюдали непосредственно после начала обработки, она развивалась после того, как опухоли немного вырастали (например, после 8 дня или позже). Рост большинства этих опухолей подавлялся только временно; однако другие никогда не демонстрировали значительный рост (<2-кратный рост по сравнению с 1 днем) или продолжали демонстрировать регрессию (<1 -кратный рост по сравнению с 1 днем) пока животных не умерщвляли.

Кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для Нер3В-исследования (частичная доза CBL0137) показана на фиг. 4, панель В. Следует отметить, что отсутствие эффективности, наблюдаемое для исследования монотерапии CBL0137, вероятно и не ограничиваясь теорией, было связано с применяемой субоптимальной дозой (50 мг/кг по сравнению с МПД в 70 мг/кг для дозирования каждый 4-й день). Множество других исследований для моделей прививания НСС и других опухолей продемонстрировали высокую эффективность 70 мг/кг CBL0137, вводимого вв Q4d в течение 4 недель (например, НерG2-исследование). В действительности в Нер3В-исследовании CBL0137 в дозировке 60 мг/кг был очень эффективным, и требовалось снижение до 50 мг/кг для оценки эффективности.

Для анализа средней кратности роста опухолей был выбран 15 день, так как он был наиболее поздней временной точкой, для которой было достаточно данных по всем группам для такого анализа. В этот день среднее изменение объема опухоли по сравнению с 1 днем составляло 21,0 раз в группе 1 (базовый раствор) по сравнению с 10,2 разами в группе 2 (только сорафениб), 13,0 раз в группе 3 (только CBL0137) и 4,3 раз в группе 4 (CBL0137+сорафениб). Таким образом, рост опухолей между 1 и 15 днем ингибировался на 51,4% в группе 2, 38,2 % в группе 3 и 79,6% в группе 4. Снижение средней кратности роста опухолей на 15 день в комбинированно обрабатываемой группе (группе 4) было статистически значимым по сравнению с обрабатываемой базовым раствором группой 1 ($P<0,0053$; табл. 3.2.1). Однако разница в средней кратности роста опухолей между любой группой монотерапии (группа 2 или 3) и обрабатываемой базовым раствором группой не была значительной ($P>0,05$).

Анализ всех остальных параметров роста опухолей (dT, время до достижения конечной точки, замедление роста, Т/С %) дал сходные результаты: наблюдали тенденцию к повышению противоопухолевой эффективности в обрабатываемых лекарственными препаратами группах, при этом монотерапия CBL0137 оказывала заметное благоприятное действие по сравнению с обработкой базовым раствором, монотерапия сорафенибом оказывала более сильное благоприятное действие, а комбинация CBL0137+сорафениб оказывала самое сильное действие. Для параметров, подлежащих статистическому анализу (dT и медианное время до достижения конечной точки), разница между группами, обрабатываемыми комбинацией и базовым раствором, была статистически высокосignificantной ($P<0,0001$), в то время как разница между любой обрабатываемой одним лекарственным препаратом группой и обрабатываемой базовым раствором группой не достигала статистической значимости ($P>0,05$; хотя разница в медианном времени до достижения конечной точки между обрабатываемыми сорафенибом и обрабатываемыми базовым раствором группами была почти значимой: $P=0,0534$).

В соответствии с открытием, что обработка CBL0137+сорафенибом была эффективной против опухолей Нер3В по сравнению с базовым раствором, в то время как отдельные лекарственные препараты не были эффективны, прямое сравнение трех обрабатываемых лекарственными препаратами групп показало, что в общем случае (для большинства параметров) комбинация была более эффективной чем любой отдельный лекарственный препарат, а между группами, обрабатываемыми каким-либо одним лекарственным препаратом, не было статистической разницы. Это было в случае dT, времени до достижения конечной точки и % ингибирования роста на 15 день (для сравнения комбинации только с CBL0137). Средняя кратность роста опухолей на 15 день была наивысшей в группе 3 (только CBL0137; 13,0 раз), затем следовала Группа 2 (только сорафениб; 10,2 раз) и группа 4 (CBL0137+сорафениб; 4,3 раз), но эта разница не достигала статистической значимости. Позже в Нер3В-исследовании (частичная доза CBL0137) разница в среднем росте опухолей между обрабатываемыми лекарственными препаратами группами была более очевидной, так как опухоли в обрабатываемых одним лекарственным препаратом группах продолжали экспоненциально расти, в то время как в обрабатываемых комбинацией группах они подавлялись. Таким образом, на 19 день (наиболее поздняя временная точка, для которой было достаточно данных для статистического анализа по всем трем обрабатываемым лекарственными препаратами группам) средняя кратность роста опухолей составляла 19,5 раз и 21,8 раз в группах 2 и 3, соответственно, по сравнению с 5,6 разами в группе 4. Для этой временной точки снижение средней кратности роста

опухолей в обрабатываемой комбинацией группе по сравнению с любой группой монотерапии было близко к статистически значимому ($P=0,0666$ для сравнения групп 2 и 4, и $P=0,0522$ для сравнения групп 3 и 4). MBV возрастало как в группе CBL0137+сорафениб ($P=0,0216$), так и в группе монотерапии сорафенибом ($P=0,0415$) по сравнению с группой монотерапии CBL0137, но разница между группой CBL0137+сорафениб и сорафенибом не была значимой ($P=0,3819$).

В целом, не ограничиваясь теорией, результаты для HerG2 показали, что хотя обработка одним сорафенибом не оказывала влияние на рост опухоли HerG2, обработка CBL0137 была высокоэффективной. Добавление сорафениба в схему CBL0137 не усиливало ее противоопухолевый эффект в условиях, применяемых в исследовании. Для HerG2-исследования (частичная доза CBL0137), не ограничиваясь теорией, результаты показали, что исследуемые схемы монотерапии сорафенибом и монотерапии CBL0137 эффективно подавляли рост опухолей HerG2 и демонстрировали сходные уровни эффективности. Неожиданно комбинация схем сорафениба и CBL0137 привела к большей противоопухолевой эффективности, чем обработка любым одним из лекарственных препаратов (синергизм).

Кроме того, не ограничиваясь теорией, результаты для Her3B показали, что все применяемые схемы монотерапии сорафенибом, монотерапии CBL0137 и обработки комбинацией CBL0137+сорафениб были эффективны в подавлении роста привитых опухолей Her3B. При этом в этой модели CBL0137 и CBL0137+сорафениб были более эффективными в качестве противоопухолевых агентов, чем сорафениб. Уровень подавления опухолей, обеспечиваемый CBL0137 и CBL0137+сорафениб, был сходным, наиболее вероятно, благодаря комбинированному действию (i) высокой эффективности применяемой дозы CBL0137 и (ii) снижения дозы сорафениба в обрабатываемой комбинацией группе из-за потери массы животными. Следовательно, в Her3B-исследовании было невозможно определить, приводит ли комбинирование двух лекарственных препаратов к повышению противоопухолевой эффективности. Эта ситуация сходна с наблюдаемой в HerG2-исследовании, в котором применяемая доза CBL0137 имела высокую эффективность против привитых опухолей HerG2 НСС и, таким образом, препятствовала наблюдению какого-либо дополнительного благоприятного действия от комбинирования CBL0137 и сорафениба. Последующее исследование модели HerG2, проводимое с откорректированными дозами лекарственного препарата (HerG2-исследование (частичная доза CBL0137)) выявило повышение эффективности комбинации CBL0137+сорафениб по сравнению с любым одним лекарственным препаратом. Сходные результаты, не ограничиваясь теорией, наблюдали для исследования модели Her3B, проводимого с откорректированными дозами лекарственного препарата (Her3B-исследование (частичная доза CBL0137)).

Аналогичные вышеописанным исследования на мышах проводили *in vitro*, чтобы определить возможный механизм подавления опухолей в случае обработки комбинацией CBL0137+сорафениб. На фиг. 5 (панели А и В) проиллюстрированы результаты вестерн-блоттинга для несущих опухоль HerG2 и Her3B мышей через 2 и 24 ч после обработки базовым раствором, CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом. В частности, при помощи вестерн-блоттинга исследовали действие обработки лекарственным препаратом на экспрессию белков spt16, SSRP1, p53, p21, P-ERK, ERK, Mcl-1 и GAPDH (контроль), большинство из которых вовлечено в прохождение и регуляцию клеточного цикла. SSRP1/spt16 является известной мишенью для активности CBL0137, следовательно, CBL0137 вызывал тесное связывание (обратимое) субъединиц, что приводило к снижению экспрессии через 2 ч. Известно, что CBL0137 индуцирует p53 и мишень p53, p21 (только в случае HerG2, так как в Her3B отсутствует p53), но, как видно по данным вестерн-блоттинга, сорафениб блокировал эту индукцию. Известно, что сорафениб блокирует фосфорилирование P-ERK, а также вызывает понижение регуляции Mcl-1. CBL0137 не влияет на это при комбинированной обработке.

Дополнительные *in vitro* исследования проводили с целью объяснить возможный механизм подавления опухолей в случае обработки комбинацией CBL0137+сорафениб. На фиг. 6 (панели А - D) проиллюстрировано действие обработки CBL0137, сорафенибом или CBL0137+сорафенибом на экспрессию генов-мишеней NF-κB (ИЛ-8 и ФНО) для несущих опухоль бестимусных мышей (HerG2 и Her3B), определяемую при помощи ПЦР в режиме реального времени с генноспецифическими праймерами и зондом. Известно, что CBL0137 ингибирует NF-κB. Следовательно, через 2 ч после обработки лекарственным препаратом экспрессия генов-мишеней NF-κB (ИЛ-8 и ФНО) должна снижаться. Это наблюдали как для базальной NF-κB-опосредуемой транскрипции, так и для ФНО-индуцированной активности NF-κB. Также наблюдали действие сорафениба на экспрессию генов-мишеней NF-κB, хотя и меньшее, чем для CBL0137. И наконец, в отношении экспрессии генов-мишеней NF-κB наблюдали сильный синергетический эффект CBL0137 и сорафениба с практически полным прекращением экспрессии ФНО и ИЛ-8 в обеих клеточных линиях НСС. Не ограничиваясь теорией, комбинированное действие CBL0137 и сорафениба частично объясняется влиянием на путь NF-κB.

Пример 2. Оценка обработки комбинацией CBL0137+гемцитабин против ксенографтов рака поджелудочной железы (или немелкоклеточного рака легкого H1975).

Для определения влияния обработки комбинацией CBL0137+гемцитабин на рак поджелудочной железы и немелкоклеточный рак легкого проводили такие же исследования на мышах, как описанные в примере 1. Кинетика смертности для разных групп PDA-исследования представлена на фиг. 7, панель А.

В этом исследовании не было свидетельств какого-либо существенного влияния токсичности обработки на смертность животных. Обработка лекарственным препаратом не приводила к ранней смертности и не оказывала негативного влияния на МВВ по сравнению с обработкой базовым раствором. Ни одна мышь в этом исследовании не была умерщвлена вследствие чрезмерной потери массы/заболеваемости. Все случаи смерти в этом исследовании были связаны с достижением опухолями размера, соответствующего конечной точке, или, в случае обрабатываемых комбинацией животных, с завершением исследования (89 день). Следовательно, разница в кинетике конечной смертности и выживаемости в этом исследовании отображает, главным образом, эффективность лечения, а не токсичность, и дополнительно обсуждается ниже.

Кинетика смертности для разных групп PDA-исследования представлена на фиг. 7, панель В. МВВ невозможно точно рассчитать для групп, обрабатываемых комбинацией двух лекарственных препаратов, так как к концу исследования (88 день) выжило большинство мышей в этих группах. Смертность в этом исследовании была связана, главным образом, с ростом опухолей, но не с токсичностью обработки. Также разница в кинетике конечной смертности и выживаемости в этом исследовании отображает, главным образом, эффективность лечения, а не токсичность, и дополнительно обсуждается ниже.

Кинетика смертности для разных групп NSCLC-исследования 1 представлена на фиг. 8, панель А. Во время курса исследования ни одно из наблюдений у клеток не указывало на какую-либо токсичность исследуемых схем (монотерапия CBL0137, монотерапия гемцитабином или комбинация CBL0137+гемцитабин). Все случаи смерти в этом исследовании были связаны с умерщвлением вследствие достижения опухолями размера 2000 мм³, соответствующего конечной точке. Следовательно, medianное время выживания было напрямую связано с опухолевой нагрузкой и обсуждается ниже.

Кинетика смертности для разных групп NSCLC-исследования 2 представлена на фиг. 8, панель В. В четырех исследуемых группах (базовый раствор, CBL0137, гемцитабин и CBL0137+гемцитабин) не наблюдали признаков заболеваемости у какого-либо из животных. Обработка лекарственным препаратом в этих группах не приводила к ранней смертности и не оказывала негативного влияния на МВВ по сравнению с обработкой базовым раствором. Все случаи смерти в группе 1 и при обработке одним лекарственным препаратом были связаны с умерщвлением вследствие достижения опухолями размера 2000 мм³, соответствующего конечной точке. Для двух мышей в группе CBL0137+гемцитабин во время умерщвления была отмечена изъязвленность опухолей, но их размер также приближался к конечной точке (1547 и 1921 мм³). Две мыши в исследовании (обе из обрабатываемой CBL0137 группы) выжили на 89 день (конец исследования). Одну из этих мышей исключили из всех анализов, так как при вскрытии было обнаружено, что ее "опухоль" в действительности является увеличенным лимфатическим узлом, а не опухолью. Другая выжившая на 89 день мышь имела опухоль, чей размер приближался к конечной точке (1643 мм³). Следовательно, МВВ было напрямую связано с опухолевой нагрузкой и обсуждается ниже.

После этого определяли противоопухолевую эффективность исследуемых схем обработки путем измерения опухолей в течение курса исследования при помощи цифровых калиперов.

Кинетика роста опухолей для каждого исследования PDA и NSCLC (представленная средней кратностью изменения объема опухоли на группу в разные дни в течение курса обработки по сравнению с начальным объемом) приведена на фиг. 9 и 10 (панели А и В).

В частности, на фиг. 9, панель А, показана кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для исследования PDA №13756. Чтобы сравнить все обрабатываемые лекарственными препаратами группы с обрабатываемой базовым раствором группой, оценивали рост опухолей на 15 день - наиболее позднюю временную точку, для которой было достаточно данных по всем группам для анализа. Все исследуемые обработки лекарственными препаратами за исключением монотерапии CBL0137 демонстрировали противоопухолевую эффективность по сравнению с обрабатываемой базовым раствором группой 1. Эта эффективность проявлялась в уменьшении средней кратности роста опухолей на 15 день по сравнению с обрабатываемым базовым раствором контролем, а также в уменьшенном размере обрабатываемых опухолей по сравнению с контрольными опухолями на 15 день (Т/С %) и увеличении времени, необходимом для достижения опухолями размера, соответствующего конечной точке. В случае одного гемцитабина и CBL0137+гемцитабин средняя кратность роста опухолей на 15 день составляла <1,0, свидетельствуя о том, что опухоли не только не росли, но даже уменьшались относительно своего размера в начале обработки лекарственным препаратом. В действительности, большинство отдельных опухолей в этих группах (⁸/₁₀ и ⁵/₆, соответственно) регрессировали или исчезали (не было выявлено определяемой опухоли) к 15 дню. Следует отметить, что отсутствие эффективности в случае монотерапии CBL0137 в этом исследовании, вероятно, было связано с выбранной дозой. Максимальная переносимая доза и оптимальная доза CBL0137 для схемы дозирования 1х/неделю для исследований противоопухолевой эффективности составляет 90 мг/кг CBL0137.

Чтобы оценить потенциальное аддитивное/синергетическое действие разных комбинаций лекарственных препаратов, которое в общем случае не проявлялось на ранних стадиях периода обработки (т.е. по 15 день - последнюю временную точку, когда можно проводить сравнение с обрабатываемой базовым раствором контрольной группой), при возможности также оценивали рост опухолей на 29 день (последний день периода обработки) и на 54 день (наиболее поздняя временная точка с достаточным для анализа

количеством мышей, оставшихся в сравниваемых группах). Сравнение гемцитабина, CBL0137 и их комбинации показало, что на 15 день рост опухолей в обеих группах - обрабатываемых гемцитабином и гемцитабином+CBL0137 - снижался по сравнению с группой CBL0137. Таким образом, по сравнению с 30,4-кратным средним ростом опухолей на 15 день в группе CBL0137, рост опухолей был 0,55-кратным в группе гемцитабина ($P=0,0014$) и 0,4-кратным в группе гемцитабин+CBL0137 ($P=0,0075$). Действие гемцитабина и гемцитабина+CBL0137 на рост опухолей на 15 день не отличалось ($P>0,999$). На 29 день в группе CBL0137 не было опухолей, достаточных для анализа, но группы гемцитабина и гемцитабина+CBL0137 оставались неразличимыми в контексте роста опухолей (регрессия всех опухолей в обеих группах). К 54 дню опухоли начали расти в обеих группах; при этом опухоли в группе гемцитабин+CBL0137 росли медленнее, чем в группе монотерапии гемцитабином. Таким образом, на 54 день средняя кратность роста опухолей в группе гемцитабина составляла 26,7 раз, в то время как в группе гемцитабин+CBL0137 она составляла только 2,8 раз ($P=0,009$). О большей эффективности гемцитабина+CBL0137 по сравнению с любым одним лекарственным препаратом также свидетельствовало увеличенное время выживания животных в обрабатываемой комбинацией группе (78 по сравнению с 54 днями в случае одного гемцитабина ($P=0,0153$) и 17 днями в случае одного CBL0137 ($P=0,0017$). Эти результаты свидетельствуют, не ограничиваясь теорией, что CBL0137 усиливал действие гемцитабина даже в условиях, когда он не был эффективен сам по себе.

На фиг. 9, панель В, показана кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для PDA-исследования. Чтобы сравнить все обрабатываемые лекарственными препаратами группы с обрабатываемой базовым раствором группой, оценивали рост опухолей на 29 день - последний день периода обработки. Все исследуемые обработки лекарственными препаратами демонстрировали противоопухолевую эффективность по сравнению с обрабатываемой базовым раствором группой 1. Эта эффективность проявлялась в уменьшении средней кратности роста опухолей на 29 день по сравнению с обрабатываемой базовым раствором контрольной группой. Это уменьшение средней кратности роста опухолей соответствовало ингибированию роста опухолей от 66,9% до 98,1%. Эффект подавления опухолей для всех исследуемых обработок лекарственными препаратами также был проиллюстрирован меньшим размером обрабатываемых опухолей по сравнению с контрольными опухолями на 29 день (Т/С %) и увеличенным временем, необходимым для достижения опухолями размера, соответствующего конечной точке. Для всех обрабатываемых лекарственными препаратами групп за исключением одного CBL0137 средняя кратность роста опухолей на 29 день составляла $<1,0$, что свидетельствует о том, что в среднем опухоли не только не росли, но даже уменьшались относительно своего размера в начале обработки лекарственным препаратом. Только $1/9$ и $3/10$ отдельных опухолей демонстрировали регрессию на 29 день в группах базового раствора и CBL0137, соответственно. В противоположность этому, большинство отдельных опухолей в группах, обрабатываемых гемцитабином ($6/6$) и CBL0137+гемцитабином ($8/8$) регрессировали или исчезали (не было выявлено определяемой опухоли) к 29 дню. На способность каждой исследуемой схемы с одним лекарственным препаратом подавлять рост опухолей также указывало увеличенное время выживания в этих группах по сравнению с группой базового раствора. Таким образом, МВВ возросло от 46 дней в группе базового раствора до 76,5 и 74 дней в группах, обрабатываемых гемцитабином и CBL0137, соответственно. МВВ невозможно было оценить для группы, обрабатываемой двумя лекарственными препаратами, так как большинство животных в этой группе выжило на момент окончания исследования. Однако, даже без расчета МВВ *per se* (в чистом виде), потенциальная эффективность комбинированной обработки подтверждается тем фактом, что ни одно ($0/5$) из обрабатываемых базовым раствором животных не выжило к моменту окончания исследования, в то время как $3/5$ животных в группе гемцитабин+CBL0137 выжило.

Чтобы сравнить относительную противоопухолевую эффективность обработки разными лекарственными препаратами, рост опухолей оценивали не только на 29 день (последняя временная точка, когда можно было проводить сравнение с контрольной группой, обрабатываемой базовым раствором), но также на 57 день (через месяц после окончания периода обработки) и на 71 день (последняя временная точка с достаточным для анализа количеством мышей, оставшихся в сравниваемых группах), когда опухоли во всех группах начали сильнее расти, а разница между группами была более очевидной. Этот анализ (средняя кратность роста опухолей на 29 день и средняя кратность роста опухолей на 57 и 71 день), а также анализ времени выживания животных (МВВ) показал, что при обработке одним лекарственным препаратом разницы в противоопухолевом действии между гемцитабином и CBL0137 не было.

Сравнение гемцитабина, CBL0137 и их комбинации показало, что для всех трех анализируемых временных точек (29, 57 и 71 дни) средняя кратность роста опухолей была ниже в комбинированной группе, чем в группе гемцитабина и группе CBL0137.

Например, для последних временных точек, когда разница между группами была более очевидной, величины средней кратности роста опухолей на 57 день составляли $0,75\pm 0,13$ при комбинированной обработке, $7,91\pm 2,7$ при обработке гемцитабином и $10,95\pm 3,1$ при обработке CBL0137; соответствующие величины средней кратности роста опухолей на 71 день составляли $2,22\pm 0,94$, $12,98\pm 3,9$ и $16,13\pm 5,7$. Как отмечено выше, разница между средней кратностью роста опухолей между монотерапией гемцитабином

и CBL0137 не была значимой для любой временной точки. Разница в росте опухолей между группой гемцитабина и комбинированной группой была значимой (5-10 раз) на 57 день и 71 день (разница на 71 день составляла $P=0,072$). Из-за немного меньшей эффективности монотерапии CBL0137 по сравнению с монотерапией гемцитабином разница в росте опухолей между группой CBL0137 и комбинированной группой составляла $P=0,0085$ для кратности роста опухолей на Д57 и $P=0,0065$ для кратности роста опухолей на Д71. О повышенной эффективности комбинации гемцитабина+CBL0137 по сравнению с любым одним лекарственным препаратом также свидетельствует разница в выживаемости животных. Хотя для обрабатываемой комбинацией группы невозможно рассчитать и оценить МВВ (так как большинство животных выжило на момент окончания исследования), в комбинированной группе время выживаемости было увеличено ($^{4/5}$ животных выжило на момент окончания исследования на 88 день; МВВ > 88 дней) по сравнению как с группой гемцитабина ($^{1/4}$ животных выжило на 88 день; МВВ=76,5 дней), так и с группой CBL0137 ($^{0/5}$ животных выжило на 88 день; МВВ=74 дня). Эти результаты свидетельствуют, не ограничиваясь теорией, что хотя и CBL0137 и гемцитабин были эффективны против роста опухоли PDA №13590 как отдельные агенты, их комбинация приводила к повышению эффективности. Хотя благоприятное действие комбинирования лекарственных препаратов было статистически значимым только в сравнении с монотерапией CBL0137, это действие также было существенным в сравнении с монотерапией гемцитабином. Не ограничиваясь теорией, эти результаты свидетельствуют, что хотя и CBL0137 и гемцитабин были эффективны против роста опухоли PDA №13590 как отдельные агенты, их комбинация приводила к повышению эффективности.

На фиг. 10, панель А, показана кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для H1975 NSCLC-исследования 1. Для анализа средней кратности роста опухолей был выбран 22 день, так как это была наиболее поздняя временная точка, когда было достаточно данных по каждой группе обработки. Этот анализ показал, что все исследуемые схемы обработки обеспечивали противоопухолевую эффективность по сравнению с обработкой базовым раствором. Средняя кратность роста опухолей на 22 день снизилась от 15,2 в обрабатываемой базовым раствором группе 1 до 2,2, 2,7 и 1,4 в обрабатываемых лекарственными препаратами группах, включая только CBL0137, только гемцитабин или их комбинацию, соответственно. Наиболее эффективной схемой была комбинация CBL0137+гемцитабин, затем монотерапия CBL0137, а затем монотерапия гемцитабином, что соответствует ингибированию роста опухолей на 22 день на 90,8%, 85,3% и 82,6%, соответственно. Кинетика роста опухолей, проиллюстрированная на фиг. 10, панель А, также указывает на большее разделение для более поздних временных точек. Анализ повторяли для средней кратности роста опухолей на 29 день (окончание периода обработки) и 40 день, когда опухоли у обрабатываемых одним лекарственным препаратом животных, но не обрабатываемых комбинацией животных, росли экспоненциально. Этот анализ свидетельствует о том, что для обеих этих поздних временных точек высокая доза комбинации CBL0137+гемцитабин была более эффективной в подавлении роста опухоли H1975, чем любой вводимый в качестве монотерапии лекарственный препарат.

Противоопухолевая эффективность всех схем подтверждалась другими оцениваемыми параметрами роста опухолей, включая время, необходимое для достижения конечной точки, замедление роста, Т/С % и медианное время выживания (МВВ). Например, МВВ возрастало от 22 дней в обрабатываемой базовым раствором группе 1 до 45,5, 51,5, 56 в обрабатываемых лекарственными препаратами группах, включая CBL0137, гемцитабин и их комбинацию, соответственно. Как обсуждалось выше, кривые выживаемости, иллюстрирующие кинетику выживаемости мышей в исследовании, показаны на фиг. 8, панель А.

На фиг. 10, панель В, показана кинетика роста опухолей в каждой исследуемой группе для H1975 NSCLC-исследования 2. При оценке противоопухолевой эффективности всех исследуемых обработок для анализа средней кратности роста опухолей был выбран 5 день, так как это была наиболее поздняя временная точка, когда было достаточно данных по каждой группе обработки. Этот анализ показал, что все исследуемые схемы обработки обеспечивали противоопухолевую эффективность по сравнению с обработкой базовым раствором. Средняя кратность роста опухолей на 5 день снизилась от 1,76 раз в обрабатываемой базовым раствором группе 1 до <1,0 раз во всех остальных исследуемых группах ($P<0,0001$). Средняя кратность роста опухолей, составляющая <1,0, свидетельствовала о регрессии опухолей и, в действительности, $^{6/9}$, $^{9/10}$ и $^{9/10}$ отдельных опухолей в группах CBL0137, гемцитабина и их комбинации, соответственно, были меньшими на 5 день, чем в начале обработки на 1 день (по сравнению с $^{1/9}$ в группе 1). Противоопухолевую эффективность обработки CBL0137, гемцитабином и CBL0137+гемцитабином также отражает повышение МВВ. В то время как МВВ составляло 16 дней в обрабатываемой базовым раствором группе 1, оно увеличилось до 40, 48,5 и 66 дней для групп CBL0137, гемцитабина и CBL0137+гемцитабин, соответственно ($P<0,0001$ для сравнения каждой обрабатываемой лекарственным препаратом группы с обрабатываемой базовым раствором группой).

Эффективность CBL0137, гемцитабина и CBL0137+гемцитабина дополнительно анализировали на 15 день (последний день, когда в группах было достаточное количество животных для сравнения обрабатываемых лекарственными препаратами групп с обрабатываемой базовым раствором группой) и 39 день (последний день, когда в группах было достаточное количество животных для сравнения между обрабатываемыми лекарственными препаратами группами). При сравнении группы CBL0137, гемцитабина и

СВL0137+гемцитабин с группой базового раствора, как видно по данным на 5 день, средняя кратность роста опухолей на 15 день была снижена во всех трех схемах обработки лекарственными препаратами. Таким образом, средняя кратность роста опухолей составляла 0,92-, 0,958- и 0,461 раз в группах СВL0137, гемцитабина и СВL0137+гемцитабин, соответственно, по сравнению с 8,52 разами в обрабатываемой базовым раствором группе 1 ($P < 0,0001$ для сравнения каждой обрабатываемой лекарственным препаратом группы с обрабатываемой базовым раствором группой). Это соответствовало 89,2%, 88,8% и 94,6% ингибирования роста опухолей на 15 день для СВL0137, гемцитабина или их комбинации, соответственно. Потенциальна противоопухолевая эффективность схем СВL0137, гемцитабина и СВL0137+гемцитабин подтверждалась дополнительными параметрами роста опухолей, включая время, необходимое для достижения конечной точки, замедление роста и Т/С %. Медианное время, необходимое для достижения конечной точки, возросло от 15,6 дней при обработке базовым раствором до 39,5, 47,8 и 66,2 дней при обработке СВL0137, гемцитабином и СВL0137+гемцитабином, соответственно ($P < 0,0001$ для сравнения каждой обрабатываемой лекарственным препаратом группы с обрабатываемой базовым раствором группой). Это соответствовало замедлению роста опухолей (по сравнению с обработкой базовым раствором), составляющему 23,9 дней для СВL0137, 32,2 дней для гемцитабина и 50,5 дней для СВL0137+гемцитабин. Как отмечено выше, повышенное МВВ (по сравнению с обработкой базовым раствором) служило дополнительным подтверждением противоопухолевой эффективности СВL0137, гемцитабина и СВL0137+гемцитабин в данном исследовании.

СВL0137, гемцитабин или их комбинацию анализировали дополнительно, чтобы определить, приводила ли комбинация СВL0137 и гемцитабина к повышению эффективности по сравнению с обработкой любым одним лекарственным препаратом. Позже в этом исследовании, в частности, после завершения периода обработки на 29 день, опухоли в обеих обрабатываемых одним лекарственным препаратом группах начали расти с намного большей скоростью, в то время как опухоли в группе СВL0137+гемцитабин продолжали подавляться. Следовательно, на 39 день (последний день исследования с достаточным для сравнения количеством выживших животных в группах) средняя кратность роста опухолей была ниже в обрабатываемой СВL0137+гемцитабином группе (0,48 раз), чем в обрабатываемой СВL0137 группе (5,7 раз; $P = 0,0004$) и в обрабатываемой гемцитабином группе (3,66 раз; $P = 0,0064$). Сравнение медианного времени до величин, соответствующих конечной точке, для этих групп дало такой же результат: между группами СВL0137 и гемцитабина разницы не было, но комбинация двух лекарственных препаратов привела к увеличению медианного времени, необходимого для достижения конечной точки, по сравнению с обработкой любым лекарственным препаратом. Аналогично, разницы в МВВ между группами монотерапии СВL0137 и гемцитабином не было (40 и 48,5 дней, соответственно; $P = 0,2087$), в то время как между группой монотерапии гемцитабином и комбинированной группой СВL0137+гемцитабин была большая разница (48,5 и 66 дней; $P < 0,0001$), а разница между группой монотерапии СВL0137 и комбинированной группой СВL0137+гемцитабин была почти значимой (40 и 66 дней; $P = 0,0603$). На момент окончания исследования (89 день) в группе монотерапии СВL0137 выжила одна несущая опухоль мышь. Однако опухоль у этой мыши (из обрабатываемой СВL0137 группы) приближалась к размеру, соответствующему конечной точке, когда мышь умертвили в конце исследования (1643 мм^3).

В целом, не ограничиваясь теорией, результаты PDA-исследования показали, что за исключением монотерапии СВL0137 обработка всеми лекарственными препаратами (монотерапии и комбинации двух лекарственных препаратов) была эффективной против полученных от пациентов привитых опухолей PDA №13756. Было обнаружено, что комбинация гемцитабина+СВL0137 была более эффективной, чем любой из лекарственных препаратов в отдельности. Эта схема обработки приводила к полной регрессии опухолей, которая сохранялась в течение ~2 недель после окончания периода обработки. В подтверждение результатов PDA-исследования, не ограничиваясь теорией, результаты PDA также показали, что обработка всеми лекарственными препаратами (монотерапии и комбинации двух лекарственных препаратов) была эффективной против полученных от пациентов привитых опухолей PDA. Исследуемые схемы с одним лекарственным препаратом (гемцитабином и СВL0137) были одинаково эффективными, а схема с двумя лекарственными препаратами СВL0137+гемцитабином была более эффективной, чем соответствующие лекарственные препараты, вводимые в виде монотерапии.

Кроме того, не ограничиваясь теорией, анализ H1975 NSCLC-исследования 1 показал, что комбинация СВL0137+гемцитабин была более эффективной в подавлении роста опухоли H1975, чем любой лекарственный препарат, вводимый в виде монотерапии. В подтверждение этих результатов, не ограничиваясь теорией, данные H1975 NSCLC-исследования 2 также показывают, что комбинированная обработка СВL0137+гемцитабином демонстрировала большую эффективность, чем любой лекарственный препарат в отдельности. Эффективность противоопухолевого действия комбинации лекарственных препаратов была проиллюстрирована их способностью поддерживать подавление/регрессию опухолей после окончания стадии обработки исследования (на 39 день исследования средний объем опухолей составлял $\sim 1/2$ от начального объема).

Аналогичные вышеописанным исследования на мышах проводили *in vitro*, чтобы определить возможный механизм подавления опухолей в случае обработки комбинацией СВL0137+гемцитабин. На фиг.

11 (панели A-D) проиллюстрированы результаты вестерн-блоттинга для несущих опухоль PDA и H1975 NSCLC мышей, обработанных базовым раствором, 2 мкМ CBL0137, 2-25 мкМ гемцитабина или CBL0137+гемцитабина. В частности, при помощи вестерн-блоттинга исследовали действие обработки лекарственным препаратом на экспрессию маркеров активности CBL0137 (SPT16 и SSRP1) и гемцитабина (ENT1, R1 и R2) в поджелудочной железе (MiaPaca2 (фиг. 11, панель A) и VxPC3 (фиг. 11, панель B), и NSCLC (H1975 (фиг. 11, панель C), и A549 (фиг. 11, панель D) *in vitro*. Клетки обрабатывали в течение 2 ч (SSRP1, SPT16) или 24 ч (ENT1, R1 и R2). После инкубации готовили растворимые белковые лизаты, используя 1× CCLR плюс ингибиторы протеаз и фосфатаз. Отдельные белковые полосы визуализировали при помощи ECL. В качестве загрузочного контроля в экспериментах использовали GAPDH. Не ограничиваясь теорией, обработка CBL0137 или комбинацией не оказывала влияния на ENT1, но при этом CBL0137 блокировал индукцию R1 и R2 (субъединиц рибонуклеотидредуктазы), когда находился в комбинации. Применяемый в виде монотерапии CBL0137 также приводил к снижению уровней субъединицы R1, при этом данный эффект был более выражен для PDA, чем для NSCLC.

Дополнительные *in vitro* исследования проводили с целью объяснить возможный механизм подавления опухолей в случае обработки комбинацией CBL0137+гемцитабин. На фиг. 12 (панели A - F) проиллюстрировано действие обработки CBL0137+гемцитабин на экспрессию CDA и dCK (двух генов, связанных с чувствительностью к гемцитабину) в клеточных линиях NSCLC и PDA после обработки 2 мкМ CBL0137, 2-25 мкМ гемцитабина или их комбинации. Экспрессию определяли при помощи ПЦР в режиме реального времени с генноспецифическими праймерами и зондом. Последний метили FAM. В качестве контрольного гена использовали В₂-микроглобулин. Уровни экспрессии определяли методом ΔΔCt. Усы представляют стандартные погрешности среднего значения. Не ограничиваясь теорией, CBL0137 снижал экспрессию CDA (цитидиндеаминазы), но не dCK (дезоксцитидинкиназы) в клеточных линиях H1975 NSCLC и MiaPaca2 PDA. CBL0137 не оказывал влияние на CDA в A549. Эта клеточная линия демонстрировала меньший ответ на CBL0137 и устойчивость к гемцитабину в одном эксперименте с прививанием.

Вместе, не ограничиваясь теорией, два *in vitro* эксперимента свидетельствуют о том, что CBL0137 может усиливать противоопухолевую активность гемцитабина посредством понижающей регуляции генов/белков, вовлеченных в регуляцию чувствительности/устойчивости к гемцитабину (например, субъединиц цитидиндеаминазы и рибонуклеотидредуктазы).

Определения

Следующие определения используются в связи с раскрытым в данном документе изобретением. Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно подразумеваются специалистами в области техники, к которой относится данное изобретение.

Используемая в данном документе форма единственного числа может относиться к одному или более чем одному.

Кроме того, термин "около", используемый в связи с приведенным числовым значением, означает приведенное числовое значение плюс или минус до 10% от этого приведенного числового значения. Например, формулировка "около 50" покрывает диапазон от 45 до 55.

Выражение "эффективное количество", используемое в связи с медицинскими применениями, представляет собой количество, эффективное для обеспечения поддающегося оценке лечения, предотвращения или снижения скорости патогенеза представляющего интерес заболевания, например, рака.

Все приведенные в данном документе процентные доли в композициях выражены относительно массы всей композиции, если не указано иное. Употребляемое в данном документе слово "включает" и его варианты не являются ограничивающими, поэтому перечисление элементов в списке не подразумевает исключение других похожих элементов, которые также могут применяться в композициях и способах согласно данной технологии. Аналогично, термин "может" и его варианты не является ограничивающим, поэтому указание того, что вариант реализации может включать определенные элементы, не исключает существование других вариантов реализации данной технологии, который не включают эти элементы или признаки.

Хотя неограничивающий термин "содержащий", являющийся синонимом таких терминов как включающий или имеющий, используется в данном документе в описании и формуле изобретения, настоящее изобретение или его варианты реализации могут в ином случае быть описаны при помощи альтернативных терминов, таких как "состоящий из" или "состоящий преимущественно из".

Употребляемые в данном документе слова "предпочтительный" и "предпочтительно" относятся к вариантам реализации технологии, которые имеют определенные преимущества при определенных обстоятельствах. При этом другие варианты реализации также могут быть предпочтительными при тех же или других условиях. Кроме того, указание одного или более предпочтительных вариантов реализации не подразумевает, что другие варианты реализации являются неприменимыми, и не исключает другие варианты реализации из рамок технологии.

Количество описанных в данном документе композиций, необходимое для достижения терапевти-

ческого эффекта, можно определить эмпирически в соответствии с традиционными процедурами для конкретной цели. В общем случае для введения терапевтических агентов (например, СВL0137 (и/или дополнительных агентов, описанных в данном документе) в терапевтических целях терапевтические агенты применяют в фармакологически эффективной дозе. "Фармакологически эффективное количество", "фармакологически эффективная доза", "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для того, чтобы оказать необходимое физиологическое действие, или количеству, способному обеспечивать необходимый результат, в частности, в случае лечения нарушения или заболевания. В контексте данного документа эффективное количество включает количество, достаточное, например, для замедления развития симптома нарушения или заболевания, изменения курса симптома нарушения или заболевания (например, замедления прогрессирования симптома заболевания), уменьшения или устранения одного или более симптомов или проявлений нарушения или заболевания и обращения симптома нарушения или заболевания. Например, введение терапевтических агентов пациенту, страдающему от рака, обеспечивает терапевтическое действие не только когда устранено или улучшено первопричинное патологическое состояние, но также когда у пациента наблюдается снижение тяжести или продолжительности связанных с заболеванием симптомов, например, снижение опухолевой нагрузки, снижение количества циркулирующих опухолевых клеток, повышение выживаемости без прогрессирования заболевания. Терапевтическое действие также включает приостановку или замедление прогрессирования первопричинного заболевания или нарушения вне зависимости от того, наступило ли улучшение.

Эффективное количество, токсичность и терапевтическую эффективность можно определить путем проведения стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения ЛД₅₀ (дозы, летальной для около 50% популяции) и ЭД₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для около 50% популяции). Дозировка может варьироваться в зависимости от применяемой дозировочной формы и применяемого пути введения. Соотношение между токсическим и терапевтическим действие дозы называется терапевтическим индексом, который можно выразить как соотношение ЛД₅₀/ЭД₅₀. В некоторых вариантах реализации изобретения предпочтительными являются композиции и способы с высоким терапевтическим индексом. Терапевтически эффективную дозу можно изначально оценить при помощи *in vitro* анализа, включая, например, анализ клеточных культур. Также дозу можно составить на животных моделях, чтобы достичь диапазона плазменной циркулирующей концентрации, который включает IC₅₀, определенную в клеточной культуре или в соответствующей животной модели. Уровни описанных композиций в плазме крови можно определять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. Действие любой конкретной дозировки можно отслеживать при помощи подходящего биоанализа. Дозировка может быть определена лечащим врачом и скорректирована, в случае необходимости, чтобы обеспечивать необходимое действие лечения.

В определенных вариантах реализации изобретения действие приводит к количественно оцениваемому изменению, составляющему по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 70% или по меньшей мере около 90%. В некоторых вариантах реализации изобретения действие приводит к количественно оцениваемому изменению, составляющему около 10%, около 20%, около 30%, около 50%, около 70% или даже около 90% или более. Терапевтическое действие также включает приостановку или замедление прогрессирования первопричинного заболевания или нарушения или снижение токсичности вне зависимости от того, наступило ли улучшение.

В определенных вариантах реализации изобретения фармакологически эффективное количество, которое лечит рак, как правило, модулирует симптомы по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40% или по меньшей мере на около 50%. В типовых вариантах реализации изобретения такие модуляции приводят, например, к статистически значимым и количественно оцениваемым изменениям в числе раковых клеток или признаках токсичности, как описано в данном документе (например, число определенных клеток в образце крови, число печеночных ферментов в образце крови и т.д.).

Эквиваленты

Хотя изобретение было описано в связи с конкретными вариантами его реализации, следует понимать, что возможны дополнительные модификации, а данная заявка включает любые вариации, применения или адаптации изобретения, которые в общем случае следуют принципам изобретения и включают такие отклонения от настоящего описания, которые соответствуют известной или общепринятой практике в данной области техники, к которой относится изобретение, и которые можно применить к основным признакам, определенным ранее в данном документе и следующим из формулы изобретения.

Для специалистов в данной области техники очевидны или они способны установить посредством проведения рутинных экспериментов многочисленные эквиваленты описанных в данном документе конкретных вариантов реализации изобретения. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в объем нижеследующей формулы изобретения.

Включение посредством ссылки

Все патенты и публикации, на которые в данном документе приведены ссылки, в полном объеме

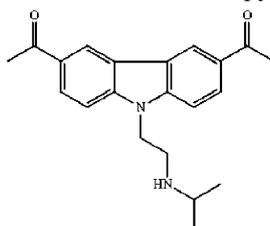
включены посредством ссылки.

Обсуждаемые в данном документе публикации приведены исключительно в отношении их содержания до даты подачи настоящей заявки. В этом отношении ничто не следует рассматривать как признание того, что настоящее изобретение не дает право датировать задним числом такую публикацию в силу действия предыдущего изобретения.

В контексте данного документа все заглавия служат только для упорядочения и никоим образом не ограничивают изобретение. Содержание любого отдельного раздела может быть одинаково применимо ко всем разделам.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения гепатоцеллюлярной карциномы, включающий введение эффективного количества CBL0137 и химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназы, нуждающемуся в этом субъекту, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназы, является сорафенибом, и где CBL0137 имеет структурную формулу



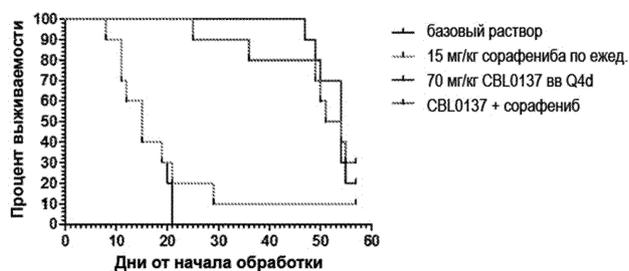
2. Способ по п.1, где CBL0137 вводят после введения химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназы.

3. Способ по п.1, где CBL0137 вводят совместно с химиотерапевтическим агентом, представляющим собой ингибитор киназы.

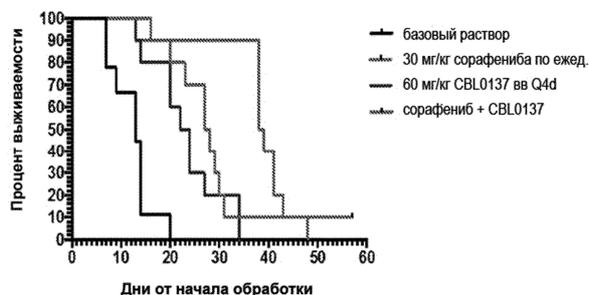
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что CBL0137 и/или химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназы, вводят внутривенно и/или перорально.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что CBL0137 и/или химиотерапевтический агент, представляющий собой ингибитор киназы, вводят в субтерапевтической дозе.

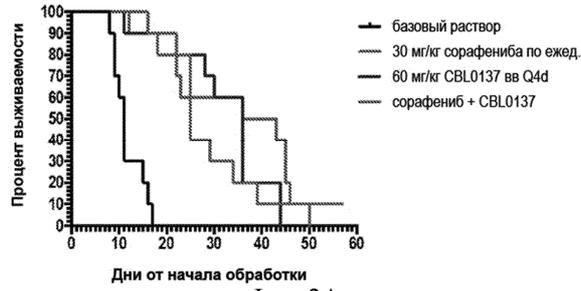
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что происходит расширение терапевтического окна CBL0137 и/или химиотерапевтического агента, представляющего собой ингибитор киназы.



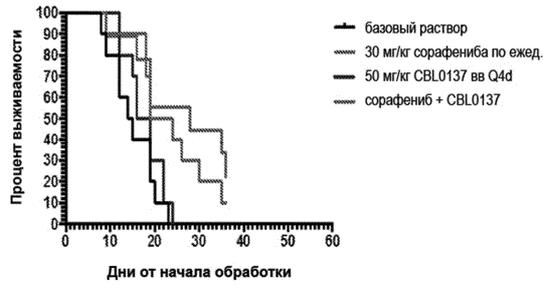
Фиг. 1А



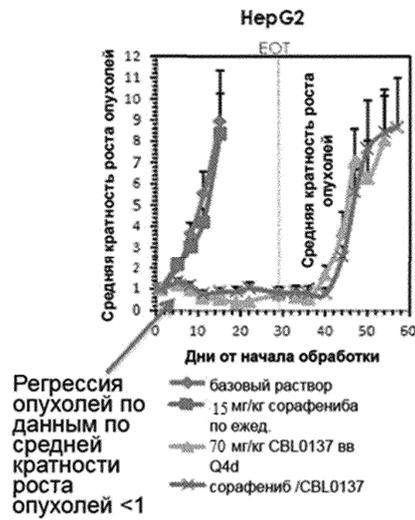
Фиг. 1В



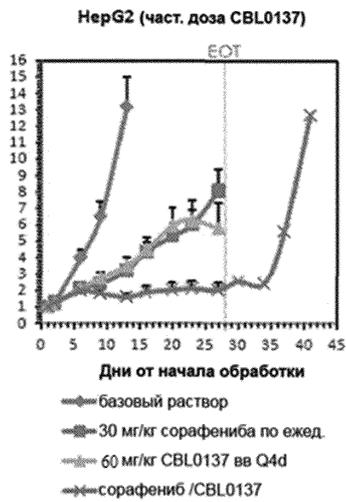
Фиг. 2А



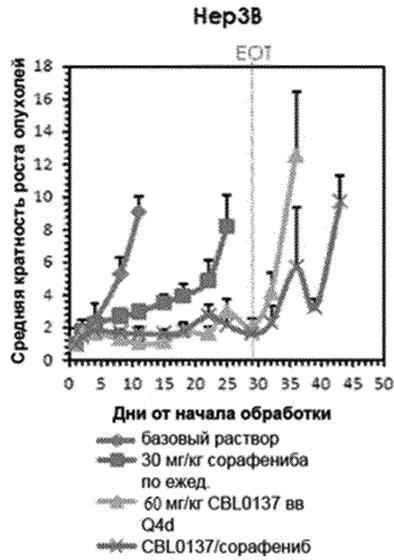
Фиг. 2В



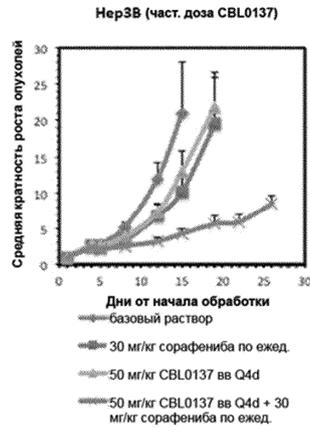
Фиг. 3А



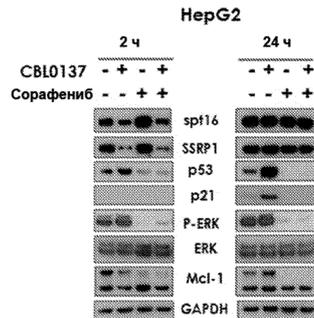
Фиг. 3В



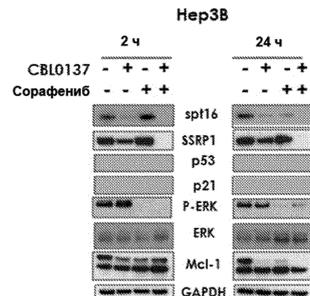
Фиг. 4А



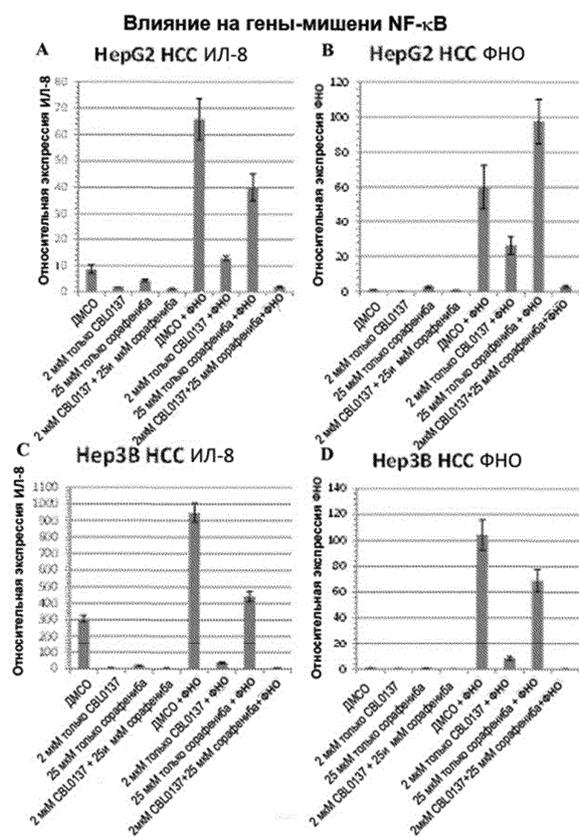
Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6

