

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091908** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.12.30**

(51) Int. Cl. *A61K 31/5377* (2006.01)  
*A61K 31/4412* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2014.12.08**

---

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

---

(31) **61/913,063; 61/934,388; 61/992,881**

(32) **2013.12.06; 2014.01.31; 2014.05.13**

(33) **US**

(62) **201691079; 2014.12.08**

(71) Заявитель:  
**ЭПИЗИМ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Кайльхак Хайке, Кнутсон Сара К.,  
Кунц Кевин У. (US)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим ингибиторы метилтрансферазы EZH2 гистонов человека и одно или несколько других терапевтических средств, в частности противоопухолевых средств, таких как преднизон, а также к способам введения в рамках комбинированной терапии нуждающимся в этом субъектам с целью лечения онкологического заболевания.

**202091908**

**A2**

**A2**

**202091908**

# **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

## **РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

В соответствии с настоящей заявкой испрашивается приоритет и преимущество согласно предварительным заявкам на выдачу патента США №№ 61/913063, поданной 6 декабря 2013 года, 61/934388, поданной 31 января 2014 года и 61/922881, поданной 13 мая 2014 года, содержание каждой из которых включено в данный документ во всей своей полноте с помощью ссылки.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

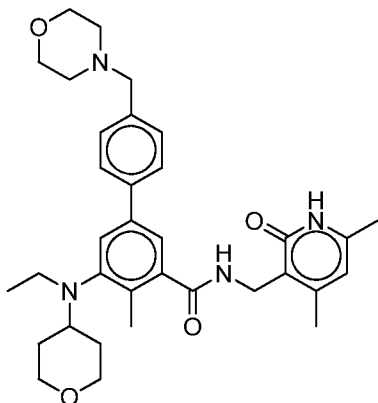
Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим ингибиторы метилтрансферазы EZH2 гистонов человека, каталитической субъединицы комплекса PRC2, которая катализирует моно-три-метилирование лизина 27 гистона H3 (H3-K27), и одно или несколько других терапевтических средств, в частности, противоопухолевых средств, а также к способам комбинированной терапии для лечения онкологического заболевания.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Лекарственные средства для комбинированной терапии для лечения онкологического заболевания стали широко распространенными, отчасти в связи с очевидным преимуществом воздействия на заболевание несколькими путями. Несмотря на то, что в течение последних нескольких десятилетий было выявлено много эффективных лекарственных средств для комбинированной терапии, ввиду остающейся высокой смертности вследствие онкологического заболевания, все еще остается потребность в выявлении эффективных схем лечения для применения в рамках противоопухолевой терапии.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение по меньшей мере частично основывается на открытии того факта, что ингибитор EZH2, такой как соединение 44 (также известный как EPZ-6438, E7438)



в комбинации с рядом средств, в том числе в соответствии с современным стандартом лечения, является очень активным в лечении определенных форм онкологических заболеваний, независимо от статуса мутации EZH2. Согласно определенному варианту осуществления онкологическое заболевание представляет собой лимфому. Согласно определенному варианту осуществления онкологическое заболевание представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL) или диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), происходящую из В-клеток герминативного центра (GCB). Согласно определенным вариантам осуществления лимфома представляет собой лимфому с мутантным EZH2. Согласно определенным вариантам осуществления лимфома представляет собой лимфому без мутации в EZH2 или лимфому с EZH2 дикого типа. Настоящее изобретение также основывается на открытии того факта, что ингибиторы EZH2, такие как соединение 44 и агонисты глюкокортикоидного рецептора (GRags), такие как преднизон, преднизолон или дексаметазон, действуют совместно с целью значительного повышения терапевтической активности при лечении онкологического заболевания. Комбинация соединения 44 и преднизолон расширяет диапазон клеток, восприимчивых к ингибированию EZH2, от клеток, только несущих мутацию, до всех клеток GCB NHL.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 и терапевтически эффективного количества средства согласно стандарту лечения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества комбинации, содержащей ингибитор EZH2 и средство согласно стандарту лечения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор EZH2 и средство согласно стандарту лечения.

Согласно определенному варианту осуществления лимфома с мутантным EZH2 характеризуется мутацией по Y646, A682 или A692.

Согласно определенным вариантам осуществления средство согласно стандарту лечения представляет собой одно или несколько соединений, выбранных из группы, состоящей из компонента R-CHOP, ингибитора BCL и ингибитора BCR.

Согласно определенным вариантам осуществления компонент R-CHOP представляет собой компонент GRag CHOP, преднизолон или дексаметазон.

Согласно определенным вариантам осуществления компонент R-CHOP представляет собой агонист рецептора глюкокортикостероидов. Согласно определенным вариантам осуществления агонист рецептора глюкокортикостероидов представляет собой преднизолон или дексаметазон.

Согласно определенным вариантам осуществления доксорубицин не включают в R-CHOP.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BCL представляет собой навитоклакс, обатоклакс или АВТ-19.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BCR представляет собой ритуксимаб, ингибитор АКТ МК-2206, иделалисиб, траметиниб, таматаниб, эверолимус или ибрутиниб.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BCR представляет собой ингибитор сигнального каскада PI3K/Akt/mTOR.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BCR представляет собой ритуксимаб, МК-2206, иделалисиб, траметиниб, таматаниб, эверолимус, VELCADE или ибрутиниб.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор EZH2 и средство согласно стандарту лечения вводят одновременно или последовательно. Согласно другим вариантам осуществления ингибитор EZH2 вводят до введения средства согласно стандарту лечения.

Согласно определенным вариантам осуществления у пациента повышается уровень экспрессии по меньшей мере одного гена. Согласно определенным вариантам

осуществления ген, уровень экспрессии которого повышается, выбран из группы, состоящей из Sestrin, TNF и GILZ. Согласно другим вариантам осуществления ген, уровень экспрессии которого повышается, представляет собой ген, являющийся мишенью глюкокортикоидов.

Согласно определенным вариантам осуществления повышение уровня экспрессии гена применяют для определения или корректировки терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 и средства согласно стандарту лечения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу отбора пациента для лечения, при этом пациента отбирают исходя из профиля экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из Sestrin, TNF и GILZ.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 и терапевтически эффективного количества средства согласно стандарту лечения, при этом у пациента повышен уровень экспрессии Sestrin, TNF или GILZ.

Согласно определенным вариантам осуществления онкологическое заболевание представляет собой устойчивое или тяжело поддающееся лечению ингибитором EZH2 онкологическое заболевание.

Согласно определенным вариантам осуществления онкологическое заболевание характеризуется повышенным уровнем метилирования H3K27.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к комбинации ингибитора EZH2 и GRag, который влияет на нечувствительность мутантных клеток, резистентных или плохо поддающихся лечению EZH2-ингибитором, в том числе клеток, несущих мутацию EZH2.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор EZH2 представляет собой соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и одно или несколько других терапевтических средств.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и прилагаемой формулы изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

**На фигурах 1A-1F** приведена серия графиков Fa-CI, демонстрирующих эффективность комбинации компонентов CHOP и соединения 44 (Cpd 44) на клеточных линиях лимфомы с мутантным EZH2, происходящей из В-клеток

герминативного центра. Соединение 44 и доксорубицин в клетках WSU-DLCL2 действуют синергетически (**Фигура 1А**) и обеспечивают дополнительный эффект в клетках SU-DHL-10 (**Фигура 1D**). Эффективность комбинации в случае мафосфамида наблюдается в клетках WSU-DLCL2 (**Фигура 1С**) и клетках SU-DHL-10 (**Фигура 1F**). Эффективность комбинации также наблюдается в случае винкристина в обеих клеточных линиях с мутантным EZH2 по Y646: в клетках WSU-DLCL2 (**Фигура**) и клетках SU-DHL-10 (**Фигура 1E**). В клетках WSU-DLCL2 дозы находились в диапазоне 0,16-20 нМ в случае доксорубицина, 0,04-5 нМ в случае винкристина, 0,156-10 мкМ в случае мафосфамида и 15-1000 нМ в случае соединения 44. В клетках SU-DHL-10 дозы находились в диапазоне 0,5-60 нМ в случае доксорубицина, 0,016-2 нМ в случае винкристина, 0,156-10 мкМ в случае мафосфамида и 1,56-100 нМ в случае соединения 44. Клетки обрабатывали согласно схеме предварительного лечения А и анализировали данные с помощью программного обеспечения Calcsyn.

**На фигурах 2А-2D** приведена серия графиков, демонстрирующих, что глюкокортикоидные агонисты повышают эффективность соединения 44 (Cpd 44) в клеточных линиях лимфомы с мутантным EZH2. Эффективность соединения 44 резко возрастает при комбинации с глюкокортикоидными агонистами. Добавление преднизолона (**Фигура 2А, 2С**) или дексаметазона (**Фигура 2В, 2D**) к 2 клеточным линиям DLBCL с мутантным EZH2 по Y646F согласно схеме для предварительной обработки А обеспечивает дозозависимый сдвиг в отношении IC50 в сторону соединения 44. В обеих клеточных линиях дозы находились в диапазоне 15 нМ-1000 нМ в случае преднизолона и 1,5 нМ-100 нМ в случае дексаметазона. Дозы соединения 44 находились в диапазоне 15-1000 нМ в клетках WSU-DLCL2 и 1,5-100 нМ в клетках SU-DHL-10.

**На фигурах 3А-3D** приведена серия графиков зависимости «доза-ответ», демонстрирующих эффективность комбинаций соединения 44 (Cpd 44) с преднизолоном или дексаметазоном в клеточных линиях GCB лимфомы WSU-DLCL2 с мутантным EZH2 (**Фигура 3А, 3В**) и DONH2 с EZH2 дикого типа (**Фигура 3С, 3D**) соответственно. Дозы соединения 44 находились в диапазоне 15,6-1000 нМ, дозы преднизолона находились в диапазоне 7,8-1000 нМ и дозы дексаметазона находились в диапазоне 0,8-100 нМ. (**Фигуры 3А и 3В**). В клетках WSU-DLCL2 с мутантным EZH2 эффективность соединения 44 в случае преднизолона или дексаметазона была повышена (**Фигуры 3С и 3D**). Для соединения 44 в качестве единственного средства не

было показано антипролиферативного эффекта в клетках DONH2 с *EZH2* дикого типа, таким образом определяли сдвиг эффективности в сторону преднизолона или дексаметазона. Эффективность преднизолона или дексаметазона была повышена с добавлением соединения 44 в клетки DONH2.

**Фигура 4** представляет собой сводную таблицу, в которой показано, что комбинация соединения 44 (Cpd 44)/глюкокортикоидный агонист решает проблему нечувствительности к ингибиторам *EZH2* (*EZH2i*) в клеточных линиях, устойчивых к ингибиторам *EZH2*. В целом, комбинация преднизолона и соединения 44 приводит к более высокой чувствительности во всех исследуемых клеточных линиях GCB, а не только в клеточных линиях, чувствительных к *EZH2i*. За исключением клеток RL, для которых последовательность добавления лекарственного средства является принципиальной, поскольку предварительное инкубирование с преднизолоном с последующим добавлением соединения 44 является неэффективным.

**На фигурах 5A и 5B** приведены два графика, демонстрирующих очень сильный синергетический эффект, наблюдаемый в клеточной линии лимфомы с мутантным *EZH2* с применением комбинации соединения 44 (Cpd 44) и другими видами целевой терапии. Очень сильный синергетический эффект наблюдался при комбинации соединения 44 с ингибитором BCL2 навитоклаксом (Фигура 5A), а также ингибитором mTOR эверолимусом (Фигура 5B). Диапазоны доз для навитоклакса составляли 0,16-10 мкМ, 0,04-5 нМ для эверолимуса и 31-2000 нМ для соединения 44. Эти данные были получены на основе схемы предварительного лечения А, и данные анализировали с помощью программного обеспечения Calcsyn.

**Фигура 6** представляет собой сводную таблицу результатов комбинаций различных лекарственных средств и/или видов лекарственной терапии с соединением 44 (Cpd 44). Эффективность комбинации с соединением 44 была достигнута для всех исследуемых лекарственных средств в клеточных линиях лимфомы с мутантным *EZH2*. Для глюкокортикоидных агонистов была продемонстрирована эффективность комбинации в случае клеточных линий GCB лимфомы с мутантным и *EZH2* дикого типа.

**На фигурах 7A-7C** приведена серия графиков, демонстрирующих, что комбинации соединения 44(Cpd 44)-СНОР проявляют повышенную противоопухолевую активность в сравнении с отдельными средствами в нескольких ксенотрансплантатных моделях лимфомы с мутантным *EZH2*. Ксенотрансплантаты

WSU-DLCL2 (EZH2 Y646F) обрабатывали соединением 44, CHOP или комбинацией в течение 28 дней, как описано в способах (**Фигура 7А**). Средние значения объема опухоли +/- SEM приведены в графическом виде. Обе дозы соединения 44, составляющие 150 мг/кг T1D и 225 мг/кг B1D, характеризовались большей статистической значимостью в отношении ингибирования роста опухоли относительно наполнителя отдельно (\*p-значение < 0,05). Обработка соединением 44 при 225 мг/кг B1D совместно с CHOP приводило к большей регрессии опухоли, чем в случае одного отдельного средства (\*\*\*p-значение < 0,001 в сравнении с наполнителем). Статистику рассчитывали с помощью ANOVA с повторными измерениями. Ксенотрансплантаты SU-DHL6 (EZH2 Y646N) обрабатывали соединением 44, CHOP или комбинацией в течение 28 дней, как описано в способах (**Фигура 7В**). Средние значения объема опухоли +/- SEM приведены в графическом виде в верхней панели. CHOP или соединение 44 в качестве отдельного средства не оказывали эффект в отношении роста опухоли, но обработка соединением 44 при 225 мг/кг B1D совместно с CHOP приводила к регрессии роста опухоли во время периода обработки, составляющего 28 дней, при этом также поддерживалась задержка роста опухоли спустя 32 дня после прекращения введения дозы (\*p-значение < 0,0001). Кривые выживаемости (нижняя панель) за период 60 дней демонстрируют значительную задержку роста опухоли у животных, обрабатываемых комбинацией соединения 44 и CHOP (\*\*p-значение < 0,05). Статистику рассчитывали с помощью двустороннего t-теста. Ксенотрансплантаты SUDHL-10 (EZH2 Y646F) обрабатывали соединением 44, COP (SOC без доксорубицина в качестве компонента) или комбинацией в течение 28 дней, как описано в способах (**Фигура 7С**). Средние значения объема опухоли +/- SEM приведены в графическом виде в верхней панели. Выживаемость в процентах за период 60 дней в исследовании задержки роста опухоли приведена в графическом виде в средней панели (Примечание: Кривые выживания для 500 мг/кг и 250 мг/кг +COP перекрываются). Сравнение средних значений веса опухоли приведено в средней панели, продемонстрированы значимые различия в весе опухоли между группами (\*p-значение < 0,05, \*\* p-значение < 0,01, \*\*\*\*p-значение < 0,0001).

**На фигурах 8А-8С** приведены панели, на которых показано изменение уровней экспрессии генов, являющихся мишенями глюкокортикоидов, *Sestrin 1* (*SESNI*, **Фигура 8А**), *TNF* (**Фигура 8В**) и *GILZ* (**Фигура 8С**), где ряд клеточных линий обрабатывали соединением 44, преднизолоном, комбинацией соединения 44 и преднизолона или



DMSO. Как показано на Фигурах 8А-8С, повышение уровней экспрессии *Sestrin 1*, *TNF* и *GILZ* наблюдалось после совместной обработки, в отличие от соединения 44 или преднизолона отдельно.

**На фигурах 9А-9D** приведены панели, на которых показано, что общее ацетилирование и триметилирование H3K27 не было затронуто при воздействии преднизолоном или при комбинированной обработке. Клетки обрабатывали в течение 4 дней преднизолоном, соединением 44 (Cpd 44) с повышением доз или комбинацией соединения 44 с преднизолоном в стабильной концентрации. Гистоны, выделенные с помощью кислоты, анализировали с помощью ELISA на предмет уровней H3K27Me3 (**Фигура 9А**) (преднизолон отдельно, левая панель; комбинация соединение 44/преднизолон, правая панель, значения IC<sub>50</sub> в виде вставок на каждом графике). В случае обработки преднизолоном, значения H3K27Me3 представлены в виде гистограммы, поскольку не наблюдали зависимые от дозы изменения для данного соединения. Клетки WSU-DLCL2 (**Фигура 9В**), OCI-LY19 (**Фигура 9С**) или RL (**Фигура 9D**) обрабатывали в течение 4 дней преднизолоном, соединением 44 с повышением доз или комбинацией соединения 44 с преднизолоном в стабильной концентрации. Гистоны, выделенные с помощью кислоты, анализировали с помощью вестерн-блоттинга на предмет уровней ацетилирования H3K27.

**На Фигуре 10** представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие, что обработка отдельным средством в случае соединения 44 или преднизолона не оказывала эффект в отношении уровней белка SMARCB1.

**На фигурах 11А и 11D** приведены графики Fa-Cl, демонстрирующие комбинационную эффективность соединения 44 и эверолимуса. **На фигурах 11В и 11Е** приведены панели, на которых показан апоптоз клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5, обработанных соединением 44, эверолимусом, комбинацией соединения 44 и эверолимуса или DMSO. **На фигурах 11С и 11F** приведены графики, демонстрирующие изменения в G1 фазе клеточного цикла, наблюдаемые после совместной обработки, в отличие от соединения 44 отдельно, как для клеток WSU-DLCL2, так и для SU-DHL-5. Сильный синергический эффект наблюдали в случае комбинации соединения 44 и эверолимуса как для клеток WSU-DLCL2, так и для SU-DHL-5 (**Фигура 11А, 11D**).

**На фигурах 12А и 12D** приведены графики Fa-Cl, демонстрирующие эффективность комбинации соединения 44 и ибрутиниба. **На фигурах 12В и 12Е**

приведены панели, на которых показан апоптоз клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5, обработанных соединением 44, ибрутинибом, комбинацией соединения 44 и ибрутиниба или DMSO. **На фигурах 12С и 12F** приведены графики, демонстрирующие изменения в G1 фазе клеточного цикла, наблюдаемые после совместной обработки, в отличие от соединения 44 отдельно, как для клеток WSU-DLCL2, так и для SU-DHL-5. Сильный синергический эффект наблюдали в случае комбинации соединения 44 и ибрутиниба как для клеток WSU-DLCL2, так и для SU-DHL-5 (**Фигуры 12А, 12D**).

**На фигурах 13А, 13D и 13G** приведены графики Fa-Cl, демонстрирующие эффективность комбинации соединения 44 и МК-2206 в клетках WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19. **На фигурах 13В, 13Е и 13Н** приведены панели, на которых показан апоптоз клеток WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19, обработанных соединением 44, МК-2206, комбинацией соединения 44 и МК-2206 или DMSO. **На фигурах 13С, 13F и 13I** приведены графики, демонстрирующие изменения в G1 фазе клеточного цикла, наблюдаемые после совместной обработки, в отличие от соединения 44 отдельно для трех клеточных линий. Сильный синергический эффект наблюдали в случае комбинации соединения 44 и МК-2206 для клеток WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и клеток OCI-LY19 (**Фигуры 13А, 13D и 13G**).

**На фигурах 14А-14С** приведены гистограммы, демонстрирующие изменение генной экспрессии EGR1, FOS, TCL1, AICDA и GJA1 при обработке клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5 соединением 44, ибрутинибом, МК-2206, комбинацией соединения 44 и ибрутиниба или комбинацией соединения 44 и МК-2206. При комбинации соединения 44 и второго средства наблюдали снижение уровня экспрессии EGR1 (в 40 раз) и FOS (в 4 раза) и повышение уровня экспрессии AICDA (в 3 раза), TCL1A (в 5 раз), и GJA1 (в 3 раза), по сравнению с наблюдениями в случае обработки одним отдельным средством (**Фигуры 14А-14С**).

**На Фигуре 15** приведена схема сигнальных путей, вовлеченных в развитие диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), и мишени ряда химиотерапевтических средств в рамках сигнального пути.

**На фигурах 16А и 16D** приведены графики, демонстрирующие изменения в G1 фазе клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5 соединением 44, эверолимусом, комбинацией соединения 44 и эверолимуса, а также DMSO. **На фигурах 16В и 16Е** приведены графики, демонстрирующие изменения в S фазе клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-

5 соединением 44, эверолимусом, комбинацией соединения 44 и эверолимуса, а также DMSO. **На фигурах 16C и 16F** приведены графики, демонстрирующие изменения в G2/M фазах клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5 соединением 44, эверолимусом, комбинацией соединения 44 и эверолимуса, а также DMSO. Через 48 часов после совместной обработки клеток SU-DHL-5 наблюдалось синергическое уменьшение количества клеток в G1, S и G2/M фазах клеточного цикла соответственно (**Фигуры 16D-16F**). При обработке клеток WSU-DLCL2 отдельными средствами или в комбинации, изменение в отношении «суб-G1» фазы клеточного цикла не наблюдалось (**Фигура 16A**). Синергическое зависимое от времени уменьшение количества клеток в S-фазе и G2/M-фазе клеточного цикла соответственно наблюдалось при обработке клеток WSU-DLCL2 комбинацией (**Фигура 16B, 16C**).

**На фигурах 17A и 17D** приведены графики, демонстрирующие изменения в G1 фазе клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5 соединением 44, ибрутинибом, комбинацией соединения 44 и ибрутиниба, а также DMSO. **На фигурах 17B и 17E** приведены графики, демонстрирующие изменения в S-фазе клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5 соединением 44, ибрутинибом, комбинацией соединения 44 и ибрутиниба, а также DMSO. **На фигурах 17C и 17F** приведены графики, демонстрирующие изменения в G2/M-фазах клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2 и SU-DHL-5 соединением 44, ибрутинибом, комбинацией соединения 44 и ибрутиниба, а также DMSO. **На фигурах 17A-17F** показано синергическое уменьшение количества клеток в G1, S и G2/M фазах клеточного цикла соответственно, через 24 часа после совместной обработки клеток WSU-DLCL2 и клеток SU-DHL-5, в сравнении с соединением 44 или ибрутинибом в качестве отдельных средств.

**На фигурах 18A, 18D и 18G** приведены графики, демонстрирующие изменения в G1 фазе клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19 соединением 44, МК-2206, комбинацией соединения 44 и МК-2206, а также DMSO. **На фигурах 18B, 18E и 18H** приведены графики, демонстрирующие изменения в S-фазе клеточного цикла, наблюдаемые после обработки клеток WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19 соединением 44, МК-2206, комбинацией соединения 44 и МК-2206, а также DMSO. **На фигурах 18C, 18F и 18I** приведены графики, демонстрирующие изменения в G2/M-фазах клеточного цикла, наблюдаемые после

обработки клеток WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19 соединением 44, МК-2206, комбинацией соединения 44 и МК-2206, а также DMSO. **На фигурах 18А-18І** показано синергическое уменьшение количества клеток в G1, S и G2/M фазах клеточного цикла соответственно, после совместной обработки клеток WSU-DLCL2 и клеток SU-DHL-5, в сравнении с соединением 44 или МК-2206 в качестве отдельных средств.

**На Фигуре 19** приведена гистограмма, демонстрирующая изменение уровней экспрессии глюкокортикоидного рецептора, нормализованных относительно контролей DMSO, для клеточных линий с EZH2 дикого типа (OCI-LY19, DOHH2), EZH2 Y646-чувствительных (WSU-DLCL2, SUDHL10) и EZH2 Y646-устойчивых (RL, SUDHL), обработанных соединением 44, преднизолоном, комбинацией соединения 44 и преднизолона или DMSO. Кратность изменения значений рассчитывали с применением способа  $\Delta\Delta C_t$  и *ACTB*, *B2M* и *GAPDH* в качестве референтных генов. Как показали результаты, уровни экспрессии глюкокортикоидных рецепторов не подвергались воздействию в клеточных линиях при комбинации.

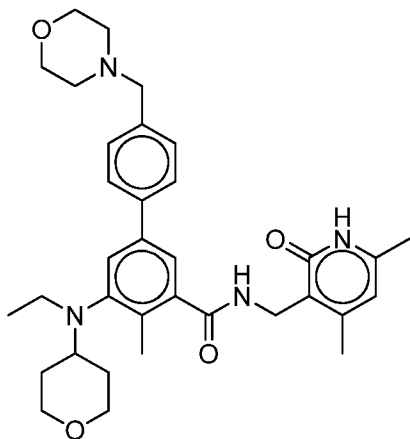
**На фигурах 20А-20С** показаны эффекты исключения одного или всех химиотерапевтических компонентов схемы CHOP для мышей с ксенотрансплантатом. **На Фигуре 20А** приведен график, демонстрирующий изменение веса опухоли у мышей с ксенотрансплантатом SUDHL10 (*EZH2* Y646F), обрабатываемых соединением 44, COP (химиотерапия без доксорубина в качестве компонента) или их комбинацией в течение 28 дней. **На Фигуре 20В** приведен график, демонстрирующий изменение веса опухоли у мышей с ксенотрансплантатом SUDHL10 (*EZH2* Y646F), обрабатываемых в течение 28 дней двумя дозами соединения 44, преднизона или их комбинацией. **На Фигуре 20С** приведен график, демонстрирующий изменение веса тела мышей с ксенотрансплантатом SUDHL10 (*EZH2* Y646F), обрабатываемых соединением 44, преднизолоном или их комбинацией (см. **Фигуру 20В**). Для мышей, получающих лечение соединением 44 в максимальной переносимой дозе или комбинацией соединения 44/COP, было показано 100% выживание на 60 день, для группы с комбинацией были показаны наименьшие значения веса опухоли на 28 день, относительно других групп лечения, в том числе с максимальной переносимой дозой для соединения 44 (**Фигура 20А**). Преднизон в определенной дозировке отдельно не индуцировал какой-либо значительный противоопухолевый эффект (**Фигура 20В**). Согласно предыдущему исследованию, введение соединения 44 давало только частичный ответ, а совместное введение соединения 44 с преднизолоном, но не в случае

схемы с 2 циклами введения преднизона, индуцировало максимально возможную регрессию, достигаемую при более высоких дозах соединения 44 отдельно.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение по меньшей мере частично основывается на открытии того факта, что соединение 44 в комбинации с рядом средств, в том числе согласно стандарту лечения, является активным в лечении определенных форм онкологических заболеваний, независимо от статуса мутации EZH2. Согласно определенному варианту осуществления онкологическое заболевание представляет собой лимфому. Согласно определенному варианту осуществления онкологическое заболевание представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL) или диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), происходящую из В-клеток герминативного центра (GCB). Согласно определенным вариантам осуществления лимфома представляет собой лимфому с мутантным EZH2. Согласно определенным вариантам осуществления лимфома представляет собой лимфому без мутации в EZH2 или лимфому с EZH2 дикого типа.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения ингибитор EZH2 представляет собой соединение 44 (также известный как EPZ-6438, E7438) следующей формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль.

Настоящее изобретение основывается на открытии того факта, что ингибиторы метилтрансферазы EZH2 гистонов и другие противоопухолевые средства можно применять в комбинации для лечения определенных типов опухолей с лучшими результатами, по сравнению с результатами, которые достигаются при лечении опухолей ингибиторами метилтрансферазы гистонов и противоопухолевыми средствами отдельно. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую ингибитор метилтрансферазы EZH2 гистонов и одно или

несколько других терапевтических средств, а также способы их применения с целью лечения заболеваний, на течение которых можно влиять посредством модулирования статуса метилирования гистонов или других белков, например, при онкологическом заболевании. Согласно определенному варианту осуществления в настоящем изобретении описывается композиция, содержащая соединение 44 и преднизон. Настоящее изобретение также включает способы комбинации терапевтических средств, предусматривающие ингибитор метилтрансферазы EZH2 гистонов и одно или несколько терапевтических средств, как например, соединение 44 и преднизон, для лечения онкологического заболевания, например, фолликулярной лимфомы (FL) и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DCLBL). В частности, способы по настоящему изобретению подходят для лечения или предупреждения онкологического заболевания или ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способам лечения или облегчения симптома онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта путем введения субъекту с экспрессией мутантного EZH2 терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 и одного или нескольких других терапевтических средств. Мутантный EZH2 по настоящему изобретению относится к мутантному полипептиду EZH2 или нуклеотидной последовательности, кодирующей мутантный полипептид EZH2. Согласно определенным вариантам осуществления мутантный EZH2 содержит одну или несколько мутаций в пределах кармана домена связывания с субстратом.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам лечения или облегчения симптома онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта путем введения субъекту с экспрессией мутантного EZH2 или EZH2 дикого типа терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 и одного или нескольких других терапевтических средств. Мутантный EZH2 по настоящему изобретению относится к мутантному полипептиду EZH2 или нуклеотидной последовательности, кодирующей мутантный полипептид EZH2. Согласно определенным вариантам осуществления мутантный EZH2 содержит одну или несколько мутаций в пределах кармана домена связывания с субстратом.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам лечения или облегчения симптома онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта путем введения субъекту с экспрессией мутантного EZH2 или

EZH2 дикого типа терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2, например, соединения 44 и одного или нескольких агонистов глюкокортикоидного рецептора (GRags), например, преднизона, преднизолона или дексаметазона. Мутантный EZH2 по настоящему изобретению относится к мутантному полипептиду EZH2 или нуклеотидной последовательности, кодирующей мутантный полипептид EZH2. Согласно определенным вариантам осуществления мутантный EZH2 содержит одну или несколько мутаций в пределах кармана домена связывания с субстратом.

Нуклеиновые кислоты и полипептиды EZH2 человека были описаны ранее. См., например, Chen et al. (1996) *Genomics* 38:30-7 [746 аминокислот]; № доступа в Swiss-Prot Q15910 [746 аминокислот]; №№ доступа в GenBank NM\_004456 и NP\_004447 (изоформа a [751 аминокислот]); и №№ доступа в GenBank NM\_152998 и NP\_694543 (изоформа b [707 аминокислот]), полное содержание которой включено в данный документ с помощью ссылки.

Для целей настоящей заявки следует понимать, что аминокислотный остаток Y641 EZH2 человека относится к тирозиновому остатку, который представляет собой или соответствует Y641 согласно № доступа в Swiss-Prot Q15910.

Также для целей настоящей заявки следует понимать, что мутантный по Y641 EZH2 человека и, эквивалентно, мутантный по Y641 EZH2, относятся к EZH2 человека, в котором аминокислотный остаток, соответствующий Y641 EZH2 дикого типа человека, замещен аминокислотным остатком, отличным от тирозина.

Согласно определенным вариантам осуществления компонент R-CHOP представляет собой компонент GRag CHOP, преднизолон или дексаметазон. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитором сигнальных путей с участием В-клеточного рецептора (BCR) является ритуксимаб, ингибитор АКТ МК-2206, иделалисиб, траметиниб, таматаниб, эверолимус или ибрутиниб.

Настоящее изобретение частично основывается на открытии того факта, что ингибиторы сигнального пути PI3K-АКТ-mTOR с участием BCR, например, иделалисиб, МК-2206 и эверолимус индуцировали очень сильный синергетический эффект в клеточных линиях WSU-DLCL2 и SU-DHL-10 при комбинации с соединением 44. Настоящее изобретение также частично основывается на открытии того факта, что комбинация соединения 44 и ингибиторов сигнального пути с участием В-клеточного рецептора, например, ибрутиниба и таматаниба, показало очень сильный синергетический эффект в обеих клеточных линиях. Согласно определенным

вариантам осуществления ингибитором рецептора BCL является навотиклакс или АВТ-199.

Согласно определенным вариантам осуществления онкологическое заболевание представляет собой неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому или неходжкинскую лимфому, происходящую из В-клеток герминативного центра.

Согласно определенным вариантам осуществления средство согласно стандарту лечения представляет собой одно или несколько соединений, выбранных из группы, состоящей из компонента R-CHOP, ингибитора BCL и ингибитора BCR.

Согласно определенным вариантам осуществления компонент R-CHOP представляет собой компонент GRag CHOP, преднизолон или дексаметазон.

Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BCR представляет собой ритуксимаб, ингибитор АКТ МК-2206, иделалисиб, траметиниб, таматаниб, эверолимус или ибрутиниб.

Согласно определенным вариантам осуществления онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание с мутантным EZH2.

Согласно определенным вариантам осуществления онкологическое заболевание представляет собой устойчивое или тяжело поддающееся лечению ингибитором EZH2 онкологическое заболевание.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 дикого типа человека, на аминокислотный остаток, отличный от тирозина.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 дикого типа человека, на фенилаланин (F). Мутантный по Y641 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется Y641F-мутантом или, эквивалентно, Y641F.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка,



соответствующего Y641 EZH2 дикого типа человека, на гистидин (H). Мутантный по Y641 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется Y641H-мутантом или, эквивалентно, Y641H.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 дикого типа человека, на аспарагин (N). Мутантный по Y641 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется Y641N-мутантом или, эквивалентно, Y641N.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 дикого типа человека, на серин (S). Мутантный по Y641 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется Y641S-мутантом или, эквивалентно, Y641S.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 дикого типа человека, на цистеин (C). Мутантный по Y641 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется Y641C-мутантом или, эквивалентно, Y641C.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по A677 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего A677 EZH2 дикого типа человека, на аминокислоту, отличную от аланина, предпочтительно на глицин (G). Мутантный по A677 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется A677-мутантом, и предпочтительно A677G-мутантом или эквивалентно A677G. A677 также называется A682.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного по A687 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека только заменой единственного аминокислотного остатка, соответствующего A687 EZH2 дикого типа человека, на аминокислоту, отличную от

аланина, предпочтительно на валин (V). Мутантный по A687 EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется A687-мутантом, и предпочтительно A687V-мутантом или эквивалентно A687V. A687 также называется A692.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность мутантного EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 дикого типа человека по одному или нескольким аминокислотным остаткам кармана домена связывания с субстратом. Мутантный EZH2 согласно данному варианту осуществления в настоящем документе называется EZH2-мутантом.

Другая иллюстративная мутация с аминокислотной заменой включает замену по аминокислоте в положении 677, 687 или 641, как например, без ограничения замена аланинового (A) остатка дикого типа на глицин (G) по аминокислоте в положении 677 (A677G); замена аланинового (A) остатка дикого типа на валин (V) по аминокислоте в положении 687 (A687V); замена тирозинового остатка (Y) дикого типа на фенилаланин (F) по аминокислоте в положении 641 (Y641F); замена тирозинового остатка (Y) дикого типа на гистидин (H) по аминокислоте в положении 641 (Y641H); замена тирозинового остатка (Y) дикого типа на аспарагин (N) по аминокислоте в положении 641 (Y641N); замена тирозинового остатка (Y) дикого типа на серин (S) по аминокислоте в положении 641 (Y641S); или замена тирозинового остатка (Y) дикого типа на цистеин (C) по аминокислоте в положении 641 (Y641C). Y641 также называется Y646.

Можно было ожидать, что гетерозиготные по EZH2 клетки будут характеризоваться злокачественным фенотипом в связи с эффективным образованием H3-K27me1 с помощью фермента дикого типа, и эффективным последующим переходом этой молекулы-предшественника в форму H3-K27me2, и, в частности, H3-K27me3, с помощью мутантных форм фермента.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение представляет собой способ ингибирования у субъекта превращения H3-K27 в триметилированный H3-K27. Ингибирование может включать ингибирование у субъекта превращения неметилированного H3-K27 в монометилированный H3-K27, превращения монометилированного H3-K27 в диметилированный H3-K27, превращения диметилированного H3-K27 в триметилированный H3-K27 или любая их комбинация, в том числе, например, превращения монометилированного H3-K27 в диметилированный H3-K27 и превращения диметилированного H3-K27 в триметилированный H3-K27. В

контексте настоящего документа неметилированный H3-K27 относится к гистону H3 без метильной группы, ковалентно связанной с аминогруппой лизина 27. В контексте настоящего документа монометилованный H3-K27 относится к гистону H3 с одной метильной группой, ковалентно связанной с аминогруппой лизина 27. Монометилованный H3-K27 в настоящем документе также называется H3-K27me1. В контексте настоящего документа диметилованный H3-K27 относится к гистону H3 с двумя метильными группами, ковалентно связанными с аминогруппой лизина 27. Диметилованный H3-K27 в настоящем документе также называется H3-K27me2. В контексте настоящего документа триметилованный H3-K27 относится к гистону H3 с тремя метильными группами, ковалентно связанными с аминогруппой лизина 27. Триметилованный H3-K27 в настоящем документе также называется H3-K27me3.

Композиция по настоящему изобретению содержит соединение 44 и одно или несколько других терапевтических средств. Соединения и составы по настоящему изобретению также пригодны для введения в качестве части комбинированной терапии с одним или несколькими другими терапевтическими средствами или методами лечения, подходящими для введения совместно, последовательно или через определенные промежутки времени. Другие соединения, подходящие для способов по настоящему изобретению, описаны в публикации США 20120264734, содержание которой включено в настоящий документ с помощью ссылки.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения ингибитор EZH2 “избирательно ингибирует” активность метилтрансферазы гистонов мутантного EZH2, при этом он ингибирует активность метилтрансферазы гистонов мутантного EZH2 более эффективно, чем он ингибирует активность метилтрансферазы гистонов EZH2 дикого типа. Например, согласно одному варианту осуществления избирательный ингибитор для мутантного EZH2 характеризуется значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере на 40 процентов ниже, чем значение IC<sub>50</sub> для EZH2 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления избирательный ингибитор для мутантного EZH2 характеризуется значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере на 50 процентов ниже, чем значение IC<sub>50</sub> для EZH2 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления избирательный ингибитор для мутантного EZH2 характеризуется значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере на 60 процентов ниже, чем значение IC<sub>50</sub> для EZH2 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления избирательный ингибитор для мутантного EZH2 характеризуется значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере на 70

процентов ниже, чем значение IC50 для EZH2 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления избирательный ингибитор для мутантного EZH2 характеризуется значением IC50, которое по меньшей мере на 80 процентов ниже, чем значение IC50 для EZH2 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления избирательный ингибитор для мутантного EZH2 характеризуется значением IC50, которое по меньшей мере на 90 процентов ниже, чем значение IC50 для EZH2 дикого типа.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения ингибитор ингибирует превращение H3-K27me2 в H3-K27me3. Согласно одному варианту осуществления сообщается, что ингибитор ингибирует триметилирование H3-K27. Поскольку превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 предшествует превращению H3-K27me2 в H3-K27me3, ингибитор превращения H3-K27me1 в H3-K27me2 также естественным образом ингибирует превращение H3-K27me2 в H3-K27me3, т. е. он ингибирует триметилирование H3-K27. Также возможным является ингибирование превращения H3-K27me2 в H3-K27me3 без ингибирования превращения H3-K27me1 в H3-K27me2. Ингибирование такого типа также приведет к ингибированию триметилирования H3-K27, даже без ингибирования диметилирования H3-K27.

Согласно одному варианту осуществления ингибитор ингибирует превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 и превращение H3-K27me2 в H3-K27me3. Такой ингибитор может непосредственно ингибировать превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 отдельно. Альтернативно, такой ингибитор может непосредственно ингибировать как превращение H3-K27me1 в H3-K27me2, так и превращение H3-K27me2 в H3-K27me3.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения соединение-ингибитор ингибирует активность метилтрансферазы гистонов. Ингибирование активности метилтрансферазы гистонов можно выявлять с применением любого подходящего способа. Ингибирование можно определять, например, или относительно уровня активности метилтрансферазы гистонов или относительно продукта активности метилтрансферазы гистонов.

Ингибирование представляет собой определяемое относительно подходящего контроля ингибирование. Согласно одному варианту осуществления ингибирование составляет по меньшей мере 10 процентов ингибирования относительно подходящего контроля. То есть, уровень ферментативной активности или количество продукта с ингибитором составляет менее чем или равняется 90 процентам относительно соответствующего уровня или количества без ингибитора. Согласно ряду других

вариантов осуществления ингибирования составляет по меньшей мере 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 или 95 процентов ингибирования относительно подходящего контроля. Согласно одному варианту осуществления ингибирование составляет по меньшей мере 99 процентов ингибирования относительно подходящего контроля. То есть, уровень ферментативной активности или количество продукта с ингибитором составляет менее чем или равняется 1 проценту относительно соответствующего уровня или количества без ингибитора.

Композиция по настоящему изобретению содержит ингибитор EZH2, или соединение 44, или его фармацевтически приемлемую соль, и одно или несколько других терапевтических средств или их фармацевтически приемлемую соль. Настоящее изобретение предусматривает введение ингибитора EZH2, или соединения 44, или его фармацевтически приемлемой соли, и одного или нескольких терапевтических средств или их фармацевтически приемлемой соли, в виде совместного состава или отдельных составов, при этом введение составов является одновременным, последовательным или через определенные промежутки времени. Согласно определенным вариантам осуществления другие терапевтические средства могут представлять собой средство, известное в уровне техники как подходящее для лечения заболевания или состояния, подлежащего лечению с помощью композиции по настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления другое терапевтическое средство может представлять собой средство, неизвестное в уровне техники как подходящее для лечения заболевания или состояния, подлежащего лечению с помощью композиции по настоящему изобретению. Согласно одному аспекту другие терапевтические средства могут представлять собой средство, которое наделяет благоприятным свойством композицию по настоящему изобретению (например, средство, которое влияет на вязкость композиции). Благоприятное свойство для композиции по настоящему изобретению включает без ограничения фармакокинетическое или фармакодинамическое взаимодействие как результат комбинации ингибитора EZH2 или соединения 44 и одного или нескольких других терапевтических средств. Например, одно или несколько других терапевтических средств могут представлять собой противоопухолевые средства или химиотерапевтические средства. Например, одно или несколько других терапевтических средств могут представлять собой глюкокортикоиды. Например, одно или несколько других терапевтических средств могут быть выбраны из преднизона, преднизолона, циклофосамида, винкристина,

доксорубицина, мафосфамида, цисплатин, AraC, эверолимуса, децитабина, дексаметазона или их функциональных аналогов, производных, пролекарств и метаболитов. Согласно другому аспекту другое терапевтическое средство может представлять собой преднизон или его активный метаболит преднизолон.

Предполагается, что изложенные ниже терапевтические средства приведены только для иллюстративных целей и не являются ограничивающими. Настоящее изобретение включает по меньшей мере одно другое терапевтическое средство, выбранное из нижеприведенных перечней. Настоящее изобретение может включать более чем одно другое терапевтическое средство, например, два, три, четыре или пять терапевтических средств, с тем, чтобы композиция по настоящему изобретению выполняла ее предназначенную функцию.

Согласно другому варианту осуществления другое терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство (также называемое противоопухолевым средством или антипролиферативным средством), выбранное из группы, включающей алкилирующее средство; антибиотик; антиметаболит; дезинтоксигирующее средство; интерферон; поликлональное или моноклональное антитело; ингибитор EGFR; ингибитор HER2; ингибитор деацетилазы гистонов; гормон; ингибитор митоза; ингибитор MTOR; мультикиназный ингибитор; ингибитор серин/треониновой киназы; ингибиторы тирозинкиназы; ингибитор VEGF/VEGFR; таксан или производное таксана, ингибитор ароматазы, антрациклин, лекарственное средство, мишенью которого является микротрубочка, лекарственное средство-ингибитор топоизомеразы, ингибитор молекулярной мишени или фермента (например, киназы или белка метилтрансферазы), аналог цитидина в качестве лекарственного средства или любое химиотерапевтическое, противоопухолевое или антипролиферативное средство, перечисленное в [www.cancer.org/docroot/cdg/cdg\\_0.asp](http://www.cancer.org/docroot/cdg/cdg_0.asp).

Настоящее изобретение предусматривает способы комбинированной терапии, согласно которым композиция, содержащая ингибитор EZH2, или соединение 44, или его фармацевтически приемлемую соль, и одно или несколько других терапевтических средств, вводят нуждающемуся субъекту с целью лечения заболевания или онкологического заболевания. Комбинированную терапию также можно применять к опухолевым клеткам для ингибирования пролиферации или индуцирования клеточной гибели. Согласно одному аспекту соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после введения композиции по настоящему изобретению, содержащей

соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтических средств. Согласно одному аспекту соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль вводят до введения композиции по настоящему изобретению, содержащей соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтических средств. Согласно одному аспекту соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после введения одного или нескольких терапевтических средств так, что другие терапевтические средства вводят или в виде одной композиции, или в виде двух или более композиций, например, вводят одновременно, последовательно, или через определенные промежутки времени. Согласно одному аспекту соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль вводят до введения одного или нескольких терапевтических средств так, что другие терапевтические средства вводят или в виде одной композиции, или в виде двух или более композиций, например, вводят одновременно, последовательно, или через определенные промежутки времени.

Согласно одному варианту осуществления композиция по настоящему изобретению включает соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль, и одно или несколько противоопухолевых средств, например, СНОР (циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин и преднизон или преднизолон) или R-СНОР (ритуксимаб, циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин, преднизон или преднизолон). Согласно одному варианту осуществления композиция по настоящему изобретению включает соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль и преднизон или преднизолон. Способы по настоящему изобретению включают комбинированную терапию, заключающуюся во введении соединения 44 или его фармацевтически приемлемой соли, и противоопухолевого средства, при этом противоопухолевые средства представляют собой компоненты СНОР, R-СНОР, преднизон или преднизолон.

Согласно определенным вариантам осуществления, предполагается, что “комбинация, содержащая ингибитор EZH2 и средство согласно стандарту лечения” включает введение терапевтических средств, не составленных совместно.

Согласно определенным вариантам осуществления предполагается, что “комбинированная терапия” включает введение этих терапевтических средств последовательным образом, при этом каждое терапевтическое средство вводят в разное время, а также введение этих терапевтических средств, или по меньшей мере двух из

терапевтических средств параллельно или практически одновременно. Одновременное введение можно осуществлять, например, путем введения субъекту одной капсулы с определенным соотношением каждого терапевтического средства, или в виде нескольких отдельных капсул для каждого из терапевтических средств. Последовательное или практически одновременное введение каждого терапевтического средства можно осуществлять любым подходящим путем, в том числе без ограничения, пероральным путем, внутривенным путем, внутримышечным путем и посредством прямого всасывания через слизистую оболочку тканей. Терапевтические средства можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первое терапевтическое средство выбранной комбинации можно вводить с помощью внутривенной инъекции, в то время как другие терапевтические средства комбинации можно вводить перорально. Альтернативно, например, все терапевтические средства можно вводить перорально или все терапевтические средства можно вводить с помощью внутривенной инъекции. Терапевтические средства также можно вводить поочередно.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения варианты комбинированной терапии, описанные в настоящем изобретении, могут вызывать синергический эффект при лечении заболевания или онкологического заболевания. “Синергический эффект” определяется как эффективность комбинации терапевтических средств, которая представляет собой больше, чем сумму эффектов каждого средства, введенного отдельно. Синергический эффект также может представлять собой эффект, который нельзя получить введением каждого из соединений или других терапевтических средств в виде отдельных средств. Синергический эффект может включать без ограничения эффект лечения онкологического заболевания в виде уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или увеличения продолжительности жизни субъекта. Синергический эффект также может включать снижение выживаемости опухолевых клеток, в том числе клеточную гибель, а также ингибирование или задержку роста опухолевых клеток.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения “комбинированная терапия” также включает введение описанных выше терапевтических средств при дополнительной комбинации с другими биологически активными ингредиентами и безмедикаментозными вариантами терапии (например, хирургическим вмешательством



или лучевой терапией). В случае, если комбинированная терапия дополнительно включает безмедикаментозное лечение, то безмедикаментозное лечение можно осуществлять в любое подходящее время, при условии, что достигается положительный эффект за счет взаимодействия в результате комбинации терапевтических средств и безмедикаментозного лечения. Например, в определенных случаях положительный эффект все еще достигается, когда безмедикаментозное лечение исключают от введения терапевтических средств, предположительно, на несколько дней или даже недель.

Согласно другому аспекту композиции по настоящему изобретению или ее фармацевтически приемлемую соль или сольват, можно вводить в комбинации с лучевой терапией. Лучевую терапию также можно применять в комбинации с композицией по настоящему изобретению и другим описанным в настоящем документе химиотерапевтическим средством, как части терапии с применением нескольких средств.

Комбинированную терапию можно осуществлять путем введения двух или более средств, например, соединения 44 и одного или нескольких других терапевтических средств, каждый из которых составляют и вводят отдельно или путем введения двух или более средств в виде одного состава. Комбинированная терапия также охватывает другие варианты комбинации. Например, два средства можно составлять вместе и вводить в комбинации с отдельным составом, содержащим третье средство. Если два или более средств комбинированной терапии можно вводить одновременно, они не обязательно должны присутствовать. Например, введение первого средства (или комбинации средств) может предшествовать введению второго средства (или комбинации средств) на минуты, часы, дни или недели. Таким образом, два или более средств можно вводить с промежутком друг от друга в минуты или с промежутком в 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 или 24 часа друг от друга, или с промежутком в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 дня друг от друга, или с промежутком в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель друг от друга. В некоторых случаях допускаются даже более длительные интервалы. Хотя в большинстве случаев желательно, чтобы два или более средств, применяемых в составе комбинированной терапии, присутствовали в организме пациента в одно и то же время, это не является обязательным.

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие соединение 44 или их фармацевтически приемлемые соли, и одно или

несколько других терапевтических средств, раскрытых в настоящем документе, смешанные с фармацевтически пригодными носителями или наполнителем(наполнителями) в дозах для лечения или предупреждения описанного в настоящем документе заболевания или состояния. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с другими терапевтическими средствами или методами лечения одновременно, последовательно или через определенные промежутки времени.

Смеси композиций по настоящему изобретению также можно вводить пациенту в виде смеси или подходящим образом составленных фармацевтических композиций. Например, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективную дозу ингибитора EZH2 или соединения 44, или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, энантиомера или стереоизомера; одно или несколько других терапевтических средств и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

“Фармацевтическая композиция” представляет собой состав, содержащий соединения по настоящему изобретению в форме, подходящей для введения субъекту. Соединение 44 и каждое из одного или нескольких других описанных в настоящем документе терапевтических средств можно составлять отдельно или в виде нескольких фармацевтических композиций в любых комбинациях активных ингредиентов. Таким образом, один или несколько путей введения можно надлежащим образом выбирать исходя из лекарственной формы каждой фармацевтической композиции. Альтернативно, соединение 44 и одно или несколько других терапевтических средств, описанных в настоящем документе, можно составлять в виде одной фармацевтической композиции.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция может быть нефасованной или в виде стандартной лекарственной формы. Стандартная лекарственная форма представляет собой любую из различных форм, в том числе, например, капсулу, мешок для IV инфузий, таблетку, инфузионный насос или аэрозольный ингалятор или флакон. Количество активного ингредиента (например, состава описанного соединения или его соли, гидрата, сольвата или изомера) в стандартной дозе композиции представляет собой эффективное количество, и оно варьирует в зависимости от конкретного предполагаемого лечения. Специалисту в данной области будет понятно, что иногда необходимо вносить общепринятые

изменения относительно дозировки, в зависимости от возраста и состояния пациента. Дозировка также будет зависеть от пути введения. Предусмотрены различные пути, в том числе пероральный, легочный, ректальный, парентеральный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, ингаляционный, буккальный, сублингвальный, интраплевральный, интратекальный, интраназальный и т. п. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения по настоящему изобретению включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, крема, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Согласно одному варианту осуществления активное соединение смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем, и с любыми необходимыми консервантами, буферами или пропеллентами.

В контексте настоящего документа фраза “фармацевтически приемлемый” относится к таким соединениям, анионам, катионам, материалам, композициям, носителям и/или лекарственным формам, которые по результатам медицинской оценки являются приемлемыми для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другого нарушения или осложнения, в соответствии с обоснованным соотношением польза/риск.

“Фармацевтически приемлемый наполнитель” означает наполнитель, пригодный для получения фармацевтической композиции, которая в целом является безопасной, нетоксичной, а также не является нежелательной ни с биологической, ни с другой точки зрения, и включает наполнитель, приемлемый для применения в области ветеринарии, а также применения в области фармацевтики применительно к человеку. В контексте настоящего описания и прилагаемой формулы изобретения “фармацевтически приемлемый наполнитель” включает как один, так и более одного таких наполнителей.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению составляют таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым для нее путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (например, ингаляция), трансдермальное (местное) и трансмукозальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин,

пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или гидросульфит натрия; хелатообразующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как цитраты или фосфаты, и средства для корректировки тоничности, такие как натрия хлорид или декстроза. Значение рН можно доводить с помощью кислот или щелочей, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Лекарственный препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, шприцы одноразового применения или флаконы для нескольких доз из стекла или пластика.

Композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью множества хорошо известных способов, применяемых на сегодняшний день для химиотерапевтического лечения. Например, для лечения онкологического заболевания, соединение по настоящему изобретению можно вводить непосредственно в опухоли, в кровяное русло или полости тела, или его можно принимать перорально, или наносить через кожу с помощью пластырей. Выбранная доза должна быть достаточной, чтобы обеспечивать эффективное лечение, но не настолько высокой, чтобы вызывать неприемлемые побочные эффекты. Стадия состояния заболевания (например, онкологическое заболевание, предраковое состояние и т. п.) и здоровье пациента следует тщательно контролировать во время и в течение целесообразного периода времени после лечения.

В контексте настоящего документа термин “терапевтически эффективное количество” относится к количеству фармацевтического средства для лечения, облегчения или предупреждения выявленного заболевания или состояния, или для проявления обнаруживаемого терапевтического или ингибиторного эффекта. Указанный эффект может быть обнаружен с помощью любого известного в уровне техники аналитического способа. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от веса тела субъекта, размера и состояния здоровья, характера и выраженности состояния, а также выбранного для введения терапевтического средства или комбинации терапевтических средств. Терапевтически эффективные количества для конкретной ситуации можно определять с помощью рутинного эксперимента, находящегося в рамках квалификации клинициста, и на его усмотрение. Согласно предпочтительному аспекту подлежащее лечению заболевание или состояние представляет собой онкологическое заболевание. Согласно другому аспекту

подлежащее лечению заболевание или состояние представляет собой нарушение, связанное с клеточной пролиферацией.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество каждого фармацевтического средства, применяемого в комбинации, будет более низким в случае применения в комбинации, по сравнению с монотерапией в случае каждого средства отдельно. Такое более низкое терапевтически эффективное количество может обеспечить более низкую токсичность при определенной схеме лечения.

Для любого соединения терапевтически эффективное количество может быть установлено изначально либо с помощью анализов в культуре клеток, например, опухолевых клеток или на животных моделях, как правило, крысах, мышах, кроликах, собаках или свиньях. Животную модель также можно применять для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такие данные затем можно применять для определения пригодных доз и путей введения для людей. Терапевтическую/профилактическую эффективность и токсичность можно определять с помощью стандартных для области фармацевтики процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например,  $ED_{50}$  (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции) и  $LD_{50}$  (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение между токсичностью и терапевтическими эффектами дозы представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен в виде соотношения  $LD_{50}/ED_{50}$ . Предпочтительными являются фармацевтические композиции, характеризующиеся высокими терапевтическими индексами. Дозировка может варьировать в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы, чувствительности пациента и пути введения.

Для обеспечения достаточных уровней активного средства(средств) или для поддержания требуемого эффекта дозировку и способ введения корректируют. Факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают тяжесть стадии заболевания, общее состояние здоровья субъекта, возраст, вес и пол субъекта, режим питания, время и частоту введения, комбинацию(комбинации) лекарственных средств, реакции чувствительности и переносимость/ответ на терапию. Фармацевтические композиции длительного действия можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или раз в две недели, в зависимости от периода полувыведения и показателя клиренса конкретного состава.

Фармацевтические композиции, содержащие активные соединения по настоящему изобретению могут быть изготовлены общеизвестным образом, например, с помощью традиционных способов смешивания, растворения, гранулирования, получения драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, включения или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно составлять традиционным образом с помощью одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей, содержащих наполнители и/или вспомогательные вещества, способствующие преобразованию активных соединений в лекарственные препараты, которые можно применять в фармацевтических целях. Разумеется, соответствующий состав зависит от выбранного пути введения.

Подходящие для применения в инъекционной форме фармацевтические композиции включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых) или дисперсии и стерильные порошки для получения по индивидуальному рецепту стерильных инъекционных растворов или дисперсии. В случае внутривенного введения, подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной, и она должна быть жидкой до такой степени, чтобы обеспечивалась возможность введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена от контаминации микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсную среду, и содержать, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно сохранять, например, путем применения эмульгатора, такого как лецитин, путем сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсии, и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов можно обеспечить с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях предпочтительным будет включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннитол и сорбитол, и натрия хлорида. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию средства, задерживающего абсорбцию, например, алюминия

моностеарата и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно получать путем введения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией перечисленных выше ингредиентов, с последующей стерилизацией и фильтрованием при необходимости. Как правило, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильную основу, содержащую исходную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, способы получения включают сушку в вакууме и лиофилизацию, в результате чего получают порошок активного ингредиента в комбинации с каким-либо требуемым ингредиентом из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Композиции для перорального применения, как правило, включают инертный разбавитель или пищевой фармацевтически приемлемый носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в виде таблеток. Для введения терапевтического средства для перорального применения, активное соединение можно включать вместе с наполнителями, и применять в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального применения также можно получать с помощью жидкого носителя для применения в виде жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе применяют перорально и осуществляют полоскание и сплевывают или глотают. Фармацевтически совместимые связующие средства и/или вспомогательные материалы можно включать как часть композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т. п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичной природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакант или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза, средство для улучшения распадаемости таблеток, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или гидрогенизированные растительные масла; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновая вкусовая добавка.

Для введения путем ингаляции соединения доставляются в форме спрей-аэрозоля из находящейся под давлением емкости или дозатора, содержащего подходящий пропеллент, например, газ, такой как углекислый газ, или распылителя.

Системное введение также можно осуществлять трансмукозальным или трансдермальным путем. Для трансмукозального или трансдермального введения в составе применяют смачивающие вещества, соответствующие барьеру, через который они должны проходить. Такие смачивающие вещества, как правило, известны в уровне техники, и включают, например, в случае трансмукозального введения, детергенты, желчные кислоты и производные фусидовой кислоты. Трансмукозальное введение можно осуществлять с помощью назального аэрозоля или суппозитория. В случае трансдермального введения, активные соединения составлены в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как правило известных в уровне техники.

Активные соединения можно получать вместе с фармацевтически приемлемыми носителями, которые будут защищать соединение от быстрого удаления из организма, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, в том числе имплантантов и системы доставки в микроинкапсулированной форме. Можно применять биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут понятны специалисту в области техники. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Pharmaceuticals, Inc. Liposomal. Суспензии липосом (в том числе липосом с моноклональными антителами против вирусных антигенов, мишенью которых являются инфицированные клетки) также можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалисту в области техники, например, описанными в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительным является составление композиций для перорального или парентерального применения в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однородности дозирования. В контексте настоящего документа, стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим для однократных дозировок, вводимых субъекту, которого лечат; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное с учетом получения требуемого эффекта, в комбинации с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению определяется и непосредственно зависит от индивидуальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта,



которого необходимо достичь.

В контексте терапевтического применения, дозировки соединений-ингибиторов EZH2, описанных в настоящем документе, других терапевтических средств, описанных в настоящем документе, композиций, содержащих соединение 44 и одно или несколько других терапевтических средств или фармацевтических композиций, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, варьируют в зависимости от средства, возраста, веса и клинического состояния пациента, получающего лечение, и оценки и решения клинициста или практикующего врача, наряду с другими факторами, влияющими на выбор дозировки. Как правило, доза должна быть достаточной для получения результата в виде замедления, а предпочтительно регрессии, роста опухолей, и также предпочтительно, результата в виде полной регрессии онкологического заболевания. Дозировки могут находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг в сутки до приблизительно 5000 мг/кг в сутки. Согласно предпочтительным аспектам дозировки могут находиться в диапазоне от приблизительно 1 мг/кг в сутки до приблизительно 1000 мг/кг в сутки. Согласно одному аспекту доза будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/сутки до приблизительно 50 г/сутки, от приблизительно 0,1 мг/сутки до приблизительно 25 г/сутки, от приблизительно 0,1 мг/сутки до приблизительно 10 г/сутки, от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 3 г/сутки или от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 1 г/сутки, в виде однократных, дробных или непрерывных доз (каждая доза может быть скорректирована в соответствии с весом пациента в кг, площадью тела в м<sup>2</sup> и возрастом в годах). Эффективным количеством фармацевтического средства является количество, которое обеспечивает объективно выявляемое улучшение, определяемое клиницистом или другим квалифицированным наблюдателем. Например, регрессия опухоли у пациента может быть определена в отношении диаметра опухоли. Уменьшение диаметра опухоли указывает на регрессию. На регрессию также указывает неспособность опухолей возникать повторно после прекращения лечения. В контексте настоящего документа термин “эффективный способ дозировки” относится к количеству активного соединения для получения требуемого биологического эффекта у субъекта или у клетки.

Фармацевтические композиции могут содержаться в емкости, упаковке или дозаторе вместе с инструкциями по применению.

Композиция по настоящему изобретению может дополнительно образовывать

соли. Композиция по настоящему изобретению может образовывать более одной соли на молекулу, например, моно-, ди-, три-. Все эти формы также охватываются объемом заявленного изобретения.

В контексте настоящего документа “фармацевтически приемлемые соли” относятся к производным соединениям по настоящему изобретению, при этом исходное соединение модифицировано путем образования его кислых или основных солей. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают без ограничения соли неорганических или органических кислот, с основными остатками, такими как амины, щелочи или органические соли с кислотными остатками, такими как карбоновые кислоты и т. п. Фармацевтически приемлемые соли включают традиционные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли, образованные из исходного соединения, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Например, такие традиционные нетоксичные соли включают без ограничения соли, полученные из неорганических и органических кислот, выбранных из 2-ацетоксибензойной, 2-гидроксиэтансульфоновой, уксусной, аскорбиновой, бензолсульфоновой, бензойной, дикарбоновой, углекислоты, лимонной, этилендиаминтетрауксусной, этионовой, 1,2-этансульфоновой, fumarовой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гликолиларсаниловой, гексилрезорциновой, гидрабиаминовой, бромистоводородной, соляной, йодистоводородной, гидроксималеиновой, гидроксинафтойной, изэтионовой, молочной, лактобионовой, лаурилсульфоновой, малеиновой, яблочной, миндальной, метансульфоновой, напсильевой, азотной, щавелевой, памоевой, пантотеновой, фенилуксусной, ортофосфорной, полигалактуроновой, пропионовой, салициловой, стеариновой, слабой уксусной, янтарной, сульфаминовой, сульфаниловой, серной, дубильной, винной, толуолсульфоновой и часто встречающихся аминокислот, например, глицина, аланина, фенилаланина, аргинина и т. д.

Другие примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли капроновой кислоты, циклопентанпропионовой кислоты, пировиноградной кислоты, малоновой кислоты, 3-(4-гидроксибензоил)бензойной кислоты, коричной кислоты, 4-хлорбензолсульфоновой кислоты, 2-нафталинсульфоновой кислоты, 4-толуолсульфоновой кислоты, камфорсульфоновой кислоты, 4-метилбицикло-[2,2,2]-окта-2-ен-1-карбоновой кислоты, 3-фенилпропионовой кислоты, триметилуксусной кислоты, трет-бутилуксусной кислоты, муконовой кислоты и т. п. Настоящее

изобретение также охватывает соли, образующиеся, когда протон кислоты, присутствующий в исходном соединении, замещается либо на ион металла, например, ион щелочного металла, ион щелочно-земельного металла или ион алюминия, либо взаимодействует с органическим основанием, таким как этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, трометамин, N-метилглюкамин и т. п.

Следует понимать, что все ссылки на фармацевтически приемлемые соли включают формы присоединения растворителя (сольваты) тех же солей.

Композицию или ее фармацевтически приемлемые соли или сольваты вводят пероральным, назальным, трансдермальным, легочным, ингаляционным, буккальным, сублингвальным, интраперитонеальным, подкожным, внутримышечным, внутривенным, ректальным, интраплевральным, интратекальным и парентеральным путем. Согласно одному варианту осуществления соединение вводят перорально. Специалисту в данной области будут понятны преимущества определенных путей введения.

Схему приема с использованием соединений выбирают в соответствии с рядом факторов, в том числе тип, вид, возраст, вес, пол и медицинское состояние пациента, тяжесть состояния, подлежащего лечению, путь введения, функция почек и печени пациента и конкретное используемое соединение или его соль. Рядовой врач или ветеринар сможет легко определить и назначить эффективное количество лекарственного средства, требуемое для предупреждения, противодействия или остановки прогрессирующего состояния.

Методики составления и введения раскрытых в настоящем изобретении соединений можно найти в *Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 19<sup>th</sup> edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). Согласно одному варианту осуществления описанные в настоящем документе соединения и их фармацевтически приемлемые соли применяют в качестве фармацевтических препаратов в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают инертные твердые наполнители или разбавители, и стерильные водные или органические растворы. В таких фармацевтических композициях соединения будут находиться в количествах, достаточных для получения требуемой величины дозировки в диапазоне, описанном в настоящем документе.

В контексте настоящего документа все процентные значения и соотношения

указаны по весу, если не указано иное. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из различных примеров. Предоставленные примеры иллюстрируют различные компоненты и методологию, полезные при применении настоящего изобретения. Примеры не ограничивают формулу изобретения. Основываясь на настоящем раскрытии, специалист в данной области сможет выявить и использовать другие компоненты и методологию, пригодные при применении настоящего изобретения.

Настоящее изобретение предусматривает композиции и способы лечения состояний и заболеваний, на течение которых можно повлиять модулированием статуса метилирования гистонов или других белков, при этом упомянутый статус метилирования, по меньшей мере частично, связан с активностью EZH2. В свою очередь, модулирование статуса метилирования гистонов может повлиять на уровень экспрессии целевых генов, активируемых посредством метилирования, и/или целевых генов, подавляемых посредством метилирования. Способ предусматривает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества композиции по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата нуждающемуся в таком лечении субъекту.

Основываясь по меньшей мере на том факте, что было показано, что аномальное метилирование гистонов ассоциировано с некоторыми онкологическими заболеваниями и предраковыми состояниями, способ лечения онкологического заболевания или предракового состояния с мутантным EZH2 у субъекта предусматривает введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения, ингибирующего метилирование. Согласно одному варианту осуществления способ лечения онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта предусматривает введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения, ингибирующего превращение неметилированного H3-K27 в монометилированный H3-K27 (H3-K27me1). Согласно одному варианту осуществления способ лечения онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта предусматривает введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения, ингибирующего превращение монометилированного H3-K27 (H3-K27me1) в диметилированный H3-K27 (H3-K27me2). Согласно одному варианту осуществления способ лечения онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта предусматривает введение

нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения, ингибирующего превращение H3-K27me2 в триметилированный H3-K27 (H3-K27me3). Согласно одному варианту осуществления способ лечения онкологического заболевания или предракового состояния у субъекта предусматривает введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества соединения, ингибирующего как превращение H3-K27me1 в H3-K27me2, так и превращение H3-K27me2 в H3-K27me3. Важно отметить, что повышение уровня метилирования при конкретном заболевании может иметь место в составе хроматина в пределах ключевых генных локусов в отсутствие общего повышения уровней метилирования гистонов или белков в клетке. Например, аномальное гиперметилирование связанных с заболеванием ключевых генов может происходить на фоне общего гиперметилирования гистонов или белков.

Обычно для модулирования клеточной пролиферации можно применять модуляторы метилирования. Например, в некоторых случаях повышенная пролиферация может быть снижена с помощью средств, снижающих уровень метилирования, тогда как недостаточная пролиферация может быть активирована с помощью средств, повышающих уровень метилирования. Таким образом, заболевания, которые могут подлежать лечению, включают заболевания, связанные с гиперпролиферацией, такие как доброкачественная опухоль и злокачественная опухоль (онкологическое заболевание).

Нарушение, в развитие которого вовлечено EZH2-опосредованное метилирование белка, может представлять собой онкологическое заболевание, нарушение, связанное с клеточной пролиферацией или предраковое состояние. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает применение композиции по настоящему изобретению или ее фармацевтически приемлемой соли или сольвата, для получения лекарственного препарата, пригодного для лечения онкологического заболевания у нуждающегося субъекта. Иллюстративные онкологические заболевания, которые могут подлежать лечению, включают лимфомы, в том числе неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому (FL) и диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), в том числе GCB лимфому.

Как правило, соединения, которые являются модуляторами метилирования, можно применять для модулирования клеточной пролиферации в целом. Например, в некоторых случаях повышенная пролиферация может быть снижена с помощью

средств, снижающих уровень метилирования, тогда как недостаточная пролиферация может быть активирована с помощью средств, повышающих уровень метилирования. Таким образом, заболевания, которые могут подлежать лечению соединениями по настоящему изобретению, включают заболевания, связанные с гиперпролиферацией, такие как доброкачественная опухоль и злокачественная опухоль.

В контексте настоящего документа “нуждающимся субъектом” является субъект с нарушением, в развитие которого вовлечено EZH2-опосредованное метилирование белка, или субъект с повышенным риском развития такого нарушения по сравнению с общей популяцией. У нуждающегося субъекта может наблюдаться предраковое состояние. Предпочтительно нуждающийся субъект страдает от онкологического заболевания. “Субъект” включает млекопитающее. Млекопитающим может быть, например, любым млекопитающим, например, человеком, приматом, птицей, мышью, крысой, собакой, кошкой, коровой, лошастью, козой, верблюдом, овцой или свиньей. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека.

В контексте настоящего изобретения субъект включает любого субъекта-человека с диагностированным онкологическим заболеванием или предраковым состоянием, с симптомами онкологического заболевания или предракового состояния или с риском развития онкологического заболевания или предракового состояния. В контексте настоящего изобретения субъект включает любого субъекта-человека с экспрессией мутантного EZH2. Например, мутантный EZH2 содержит одну или несколько мутаций, при этом мутация представляет собой замену, точечную мутацию, нонсенс-мутацию, миссенс-мутацию, делецию или вставку или любую другую описанную в настоящем документе мутацию EZH2.

Нуждающийся субъект может страдать от онкологического заболевания, тяжело поддающегося лечению или устойчивого к лечению. “Онкологическое заболевание, тяжело поддающееся лечению или устойчивое к лечению” означает онкологическое заболевание без ответа на лечение. Онкологическое заболевание может быть устойчивым вначале лечения или может приобрести устойчивость во время лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления у нуждающегося субъекта наблюдается рецидив онкологического заболевания после ремиссии в результате последнего лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления нуждающийся субъект безрезультатно получил все известные эффективные виды терапии для лечения онкологического заболевания. В некоторых вариантах осуществления нуждающийся

субъект получил по меньшей мере один вид предшествующей терапии. Согласно определенным вариантам осуществления предшествующая терапия представляет собой монотерапию. Согласно определенным вариантам осуществления предшествующая терапия представляет собой комбинированную терапию.

Согласно определенным вариантам осуществления нуждающийся субъект может страдать от вторичного онкологического заболевания в результате предыдущей терапии. “Вторичное онкологическое заболевание” означает онкологическое заболевание, возникающее в связи с предыдущими видами терапии или в результате предыдущих видов терапии, таких как химиотерапия.

У субъекта также может проявляться устойчивость к ингибиторам метилтрансферазы EZH2 гистонов или другому терапевтическому средству.

В настоящем изобретении также описывается способ подбора комбинированной терапии для субъекта с онкологическим заболеванием. Способ предусматривает стадии: обнаружения в образце от субъекта одной или нескольких описанных в настоящем документе мутаций EZH2; и подбора, исходя из наличия одной или нескольких мутаций EZH2, комбинированной терапии для лечения онкологического заболевания. Согласно одному варианту осуществления терапия включает введение субъекту композиции по настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления, способ дополнительно предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по настоящему изобретению. Мутация EZH2 может быть обнаружена с помощью подходящего способа, известного в уровне техники. Больше способов описано в публикации патента США 20130040906, полное содержание которой включено в настоящий документ с помощью ссылки.

Описанные в настоящем документе способы и применения включают стадии обнаружения в образце от нуждающегося субъекта одной или нескольких мутаций EZH2, описанных в настоящем документе, до и/или после введения субъекту композиции по настоящему изобретению (например, композиции, содержащей соединение 44) или его фармацевтически приемлемой соли, и одного или нескольких терапевтических средств). Наличие в исследуемом образце одной или нескольких описанных в настоящем документе мутаций EZH2 указывает на наличие у субъекта ответа на комбинированную терапию по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение предусматривает персонализированную медицину, лечение и/или борьбу с онкологическим заболеванием для субъекта в соответствии с

генетическим скринингом на предмет одной или нескольких описанных в настоящем документе мутаций EZH2 у субъекта. Например, настоящее изобретение предусматривает способы лечения или облегчения симптома онкологического заболевания или предракового состояния у нуждающегося субъекта в соответствии с определением у субъекта ответной реакции на комбинированную терапию, и в случае ответа субъекта на комбинированную терапию, введения субъекту композиции по настоящему изобретению. Ответную реакцию определяют путем получения образца от субъекта и обнаружения одной или нескольких описанных в настоящем документе мутаций EZH2, и наличие таких одной или нескольких описанных в настоящем документе мутаций EZH2 указывает на наличие у субъекта ответа на композицию по настоящему изобретению. После определения у субъекта ответной реакции, можно вводить терапевтически эффективное количество композиции, например, композиции, содержащей соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль, и одно или несколько терапевтических средств. Терапевтически эффективное количество композиции может быть определено рядовым специалистом в данной области.

В контексте настоящего документа термин “ответная реакция” является взаимозаменяемым для терминов “отвечающий”, “восприимчивый” и “восприимчивость”, и означает, что у субъекта проявляются терапевтические ответы при введении композиции по настоящему изобретению, например, опухолевые клетки или опухолевые ткани субъекта подвергаются апоптозу и/или некрозу, и/или характеризуются снижением роста, деления или пролиферации. Этот термин также означает, что субъект будет иметь или имеет более высокую вероятность, по сравнению с общей популяцией, проявления терапевтических ответов при введении композиции по настоящему изобретению, например, опухолевые клетки или опухолевые ткани субъекта подвергаются апоптозу и/или некрозу, и/или характеризуются снижением роста, деления или пролиферации.

Под “образцом” подразумевается любой биологический образец, полученный от субъекта, в том числе без ограничения, клетки, образцы тканей, жидкости организма (в том числе без ограничения, слезь, кровь, плазма, сыворотка, моча, слюна и семенная жидкость), опухолевые клетки и опухоли тканей. Предпочтительно, образец выбран из костного мозга, клеток периферической крови, крови, плазмы и сыворотки. Образцы могут быть получены от субъекта во время лечения или исследования. Альтернативно, образцы могут быть получены врачом согласно стандартной в уровне техники



практике.

В контексте настоящего документа термин “нарушение, связанное с клеточной пролиферацией” относится к состояниям, при котором неконтролируемый или аномальный рост, или и то, и другое, могут приводить к развитию нежелательного состояния или заболевания, которое может быть злокачественным, или может не быть злокачественным. Иллюстративные нарушения, связанные с клеточной пролиферацией, согласно настоящему изобретению охватывают ряд состояний, при которых нарушена регуляция клеточного деления. Иллюстративное нарушение, связанное с клеточной пролиферацией, включает без ограничения новообразования, доброкачественные опухоли, злокачественные опухоли, предраковые состояния, *in situ* опухоли, ограниченные опухоли, метастатические опухоли, опухоли кроветворной ткани, солидные опухоли, опухоли, связанные с иммунной системой, гематологические опухоли, онкологические заболевания, формы карциномы, формы лейкемии, формы лимфомы, формы саркомы и быстро делящиеся клетки. Термин “быстро делящаяся клетка” в контексте настоящего документа определяется как любая клетка, которая делится со скоростью, которая превышает или больше скорости, предполагаемой или наблюдаемой среди соседних или контактирующих с ней клеток в пределах этой же ткани. Нарушение, связанное с клеточной пролиферацией включает предрак или предраковое состояние. Нарушение, связанное с клеточной пролиферацией включает онкологическое заболевание. Предпочтительно, предусмотренные в настоящем документе способы применяют для лечения или облегчения симптома онкологического заболевания. Термин “онкологическое заболевание” включает солидные опухоли, а также гематологические опухоли и/или злокачественные новообразования. “Предраковая клетка” или “предопухолевая клетка” представляет собой клетку, обнаруживаемую при нарушении, связанном с клеточной пролиферацией, которое является предраком или предраковым состоянием. “Раковая клетка” или “опухолевая клетка” представляет собой клетку, обнаруживаемую при нарушении, связанном с клеточной пролиферацией, которое является онкологическим заболеванием. Можно применять любые воспроизводимые способы определения для выявления раковых клеток или предраковых клеток. Раковые клетки или предраковые клетки могут быть выявлены с помощью гистологического типирования или определение анаплазии в образце ткани (например, биоптат). Раковые клетки или предраковые клетки могут быть выявлены с помощью применения соответствующих молекулярных маркеров.

Подлежащее лечению онкологическое заболевание может быть оценено с помощью ДНК-цитометрии, проточной цитометрии или отображающей цитометрии. Подлежащее лечению онкологическое заболевание может быть определено как характеризующееся 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% количеством клеток в синтетической фазе клеточного деления (например, S-фазе клеточного деления). Подлежащее лечению онкологическое заболевание может быть определено как характеризующееся низкой долей клеток в S-фазе или высокой долей клеток в S-фазе.

В контексте настоящего документа “нормальная клетка” представляет собой клетку, которая не может классифицироваться как составляющая “нарушения, связанного с клеточной пролиферацией”. Нормальная клетка не характеризуется неконтролируемым или аномальным ростом или и тем и другим, которые могут приводить к развитию нежелательного состояния или заболевания. Предпочтительно, нормальная клетка характеризуется нормально функционирующими механизмами контрольных точек клеточного цикла.

В контексте настоящего документа “приведение клетки в контакт” относится к состоянию, при котором соединение по настоящему изобретению или другая композиция находится в непосредственном контакте с клеткой или достаточно близко для индуцирования требуемого биологического эффекта в клетке.

В контексте настоящего документа “кандидатное соединение” относится к соединению по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвату, которое было или будет исследовано в одном или нескольких *in vitro* или *in vivo* биологических анализах, с целью определения того факта, может ли указанное соединение вызывать требуемый биологический или клинический ответ клетки, ткани, системы, у животного или человека, необходимый с точки зрения исследователя или клинициста. Кандидатное соединение представляет собой соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. Биологический или клинический ответ может представлять собой лечение онкологического заболевания. Биологический или клинический ответ может представлять собой лечение или предупреждение нарушения, связанного с клеточной пролиферацией. *In vitro* или *in vivo* биологические анализы могут включать без ограничения анализы ферментативной активности, анализы изменения электрофоретической подвижности, анализы с применением репортерных генов, *in vitro* анализы жизнеспособности клеток и

описанные в настоящем документе анализы.

В контексте настоящего документа термин “лечение” или “лечить” описывает ведение и уход за пациентом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением, и включает введение соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, с целью облегчения симптомов или осложнения заболевания, состояния или нарушения, или устранения заболевания, состояния или нарушения.

Композицию по настоящему изобретению или ее фармацевтически приемлемую соль или сольват также можно применять для предупреждения заболевания, состояния или нарушения. В контексте настоящего документа термин “предупреждение” или “предупреждать” описывает снижение вероятности или устранение наступления симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения.

В контексте настоящего документа термин "облегчать" описывает процесс, за счет которого снижается степень тяжести признака или симптома нарушения. Важно отметить, что признак или симптом может быть облегчен без его устранения. Согласно предпочтительному варианту осуществления введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению приводит к устранению признака или симптома, хотя указанное устранение не требуется. Предполагается, что эффективные дозировки будут снижать степень тяжести признака или симптома. Например, признак или симптом нарушения, такого как онкологическое заболевание, который может возникать в нескольких участках, облегчается в случае, если степень тяжести онкологического заболевания снижается в пределах по меньшей мере одного из нескольких участков.

В контексте настоящего документа термин «тяжесть» описывает способность онкологического заболевания переходить из предракового состояния или доброкачественного состояния в злокачественное состояние. Альтернативно, или в дополнение, тяжесть подразумевает стадию онкологического заболевания, например, согласно системе TNM (принятой Международным союзом по борьбе с раком (UICC) и Американским объединенным комитетом по раку (AJCC)) или другим принятым в данной области способам. Стадия онкологического заболевания относится к мере или тяжести онкологического заболевания, исходя из таких факторов, как локализация первичной опухоли, размер опухоли, количество опухолей и распространение на лимфатические узлы (метастазирование в лимфатические узлы). Альтернативно или в дополнение, тяжесть подразумевает определение степени злокачественности опухоли с

помощью принятых в данной области способов (см. на сайте Национального института рака, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Степень злокачественности опухоли представляет собой систему, применяемую для классификации раковых клеток в контексте того, насколько аномальными они выглядят под микроскопом, и как быстро опухоль может расти и метастазировать. При определении степени злокачественности опухоли рассматривается множество факторов, в том числе структура и характер роста клеток. Конкретные факторы, применяемые для определения степени злокачественности опухоли, варьируют в случае каждого типа онкологического заболевания. Тяжесть также подразумевает гистологическую степень злокачественности, также называемую дифференциацией, в отношении того, насколько опухолевые клетки схожи с нормальными клетками ткани того же типа (см. на сайте Национального института рака, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Кроме того, тяжесть подразумевает степень полиморфизма ядер, в отношении размера и формы ядра опухолевых клеток и процентное количество делящихся опухолевых клеток (см. на сайте Национального института рака, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения тяжесть подразумевает степень интенсивности секреции ростовых факторов, деградации внеклеточного матрикса, васкуляризации, потери адгезии с контактирующими тканями или метастазирования. Кроме того, тяжесть подразумевает число локализаций, куда метастазировала опухоль. Наконец, тяжесть включает сложность лечения опухолей различных типов и локализаций. Например, неоперабельные опухоли при таких онкологических заболеваниях, которые обладают большим доступом к нескольким системам организма (гематологические опухоли и опухоли, связанные с иммунной системой), а также при наиболее устойчивых к традиционным типам лечения онкологических заболеваниях, рассматриваются как наиболее тяжелые. В этих случаях увеличение продолжительности жизни субъекта и/или ослабление боли, уменьшение доли опухолевых клеток или ограничение указанных клеток до пределов одной системы, улучшение в отношении стадии онкологического заболевания/степени злокачественности опухоли/гистологической степени злокачественности/степени полиморфизма ядер рассматриваются как облегчение признака или симптома онкологического заболевания.

В контексте настоящего документа термин "симптом" определяется как показатель заболевания, расстройства, поражения или какого-либо нарушения в

организме. Симптомы ощущаются и отмечаются индивидуумом, испытывающим симптом, и не могут быть отмечены другими. «Другие» определяются как не являющиеся специалистами в области медицины.

В контексте настоящего документа термин "признак" также определяется как показатель какого-либо нарушения в организме. Но признаки определяются как факторы, которые могут быть обнаружены врачом, медсестрой или другим специалистом в области медицины.

Онкологическое заболевание представляет собой группу заболеваний, которые могут быть причиной любого признака или симптома. Признаки и симптомы будут зависеть от локализации опухоли, размера опухоли и как сильно она влияет на ближайшие органы и структуры. Если онкологическое заболевание распространяется (метастазирует), тогда симптомы могут возникать в разных частях организма.

Лечение онкологического заболевания может приводить к уменьшению размера опухоли. Уменьшение размера опухоли также может быть названо "регрессией опухоли". Предпочтительно, после лечения размер опухоли уменьшается на 5% или более относительно ее размера до лечения; более предпочтительно, размер опухоли уменьшается на 10% или более; более предпочтительно, уменьшается на 20% или более; более предпочтительно, уменьшается на 30% или более; более предпочтительно, уменьшается на 40% или более; еще более предпочтительно, уменьшается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, уменьшается более чем на 75% или более. Размер опухоли может быть определен с помощью любых воспроизводимых способов определения. Размер опухоли может быть определен диаметром опухоли.

Лечение онкологического заболевания может приводить к уменьшению объема опухоли. Предпочтительно, после лечения объем опухоли уменьшается на 5% или более относительно ее размера до лечения; более предпочтительно, объем опухоли уменьшается на 10% или более; более предпочтительно, уменьшается на 20% или более; более предпочтительно, уменьшается на 30% или более; более предпочтительно, уменьшается на 40% или более; еще более предпочтительно, уменьшается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, уменьшается более чем на 75% или более. Объем опухоли может быть определен с помощью любых воспроизводимых способов определения.

Лечение онкологического заболевания приводит к уменьшению числа опухолей. Предпочтительно, после лечения количество опухолей уменьшается на 5%

или более относительно количества до лечения; более предпочтительно, количество опухолей уменьшается на 10% или более; более предпочтительно, уменьшается на 20% или более; более предпочтительно, уменьшается на 30% или более; более предпочтительно, уменьшается на 40% или более; еще более предпочтительно, уменьшается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, уменьшается более чем на 75%. Количество опухолей может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов определения. Количество опухолей может быть определено путем подсчета опухолей, видимых невооруженным глазом или при заданном увеличении. Предпочтительно, заданное увеличение является 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или 50x.

Лечение онкологического заболевания может приводить к уменьшению количества метастатических поражений в других тканях или органах, отдаленных от первичной локализации опухоли. Предпочтительно, после лечения количество метастатических поражений уменьшается на 5% или более относительно количества до лечения; более предпочтительно, количество метастатических поражений уменьшается на 10% или более; более предпочтительно, уменьшается на 20% или более; более предпочтительно, уменьшается на 30% или более; более предпочтительно, уменьшается на 40% или более; еще более предпочтительно, уменьшается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, уменьшается более чем на 75%. Количество метастатических поражений может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов определения. Количество метастатических поражений может быть определено путем подсчета метастатических поражений, видимых невооруженным глазом или при заданном увеличении. Предпочтительно, заданное увеличение является 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или 50x.

Лечение онкологического заболевания может приводить к увеличению средней продолжительности жизни популяции субъектов, получающих лечение, по сравнению с популяцией, получающей только носитель. Предпочтительно, средняя продолжительность жизни увеличивается более чем на 30 дней; более предпочтительно, более чем на 60 дней; более предпочтительно, более чем на 90 дней; и наиболее предпочтительно, более чем на 120 дней. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции средней длительности

жизни после начала лечения активным соединением. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после завершения первого цикла лечения активным соединением.

Лечение онкологического заболевания может приводить к увеличению средней продолжительности жизни популяции субъектов, получающих лечение, по сравнению с популяцией субъектов, не получающих лечение. Предпочтительно, средняя продолжительность жизни увеличивается более чем на 30 дней; более предпочтительно, более чем на 60 дней; более предпочтительно, более чем на 90 дней; и наиболее предпочтительно, более чем на 120 дней. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после начала лечения активным соединением. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после завершения первого цикла лечения активным соединением.

Лечение онкологического заболевания может приводить к увеличению средней продолжительности жизни популяции субъектов, получающих лечение, по сравнению с популяцией, получающей монотерапию лекарственным средством, которое не является соединением по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом. Предпочтительно, средняя продолжительность жизни увеличивается более чем на 30 дней; более предпочтительно, более чем на 60 дней; более предпочтительно, более чем на 90 дней; и наиболее предпочтительно, более чем на 120 дней. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после начала лечения активным соединением. Увеличение средней продолжительности жизни популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции средней длительности жизни после завершения первого цикла лечения активным соединением.

Лечение онкологического заболевания может приводить к снижению уровня смертности популяции субъектов, получающих лечение, по сравнению с популяцией,

получающей только носитель. Лечение онкологического заболевания может приводить к снижению уровня смертности популяции субъектов, получающих лечение, по сравнению с популяцией, не получающей лечение. Лечение онкологического заболевания может приводить к снижению уровня смертности популяции субъектов, получающих лечение, по сравнению с популяцией, получающей монотерапию лекарственным средством, которое не является соединением по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом. Предпочтительно, уровень смертности снижается более чем на 2%; более предпочтительно, более чем на 5%; более предпочтительно, более чем на 10%; и наиболее предпочтительно, более чем на 25%. Снижение уровня смертности популяции субъектов, получающих лечение, может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов. Снижение уровня смертности популяции может быть определено, например, путем расчета для популяции среднего количества связанных с заболеванием случаев смерти на единицу времени после начала лечения активным соединением. Снижение уровня смертности популяции также может быть определено, например, путем расчета для популяции среднего количества связанных с заболеванием случаев смерти на единицу времени после завершения первого цикла лечения активным соединением.

Лечение онкологического заболевания может приводить к снижению скорости роста опухоли. Предпочтительно, после лечения скорость роста опухоли снижается по меньшей мере на 5% относительно показателей до лечения; более предпочтительно, скорость роста опухоли снижается по меньшей мере на 10%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 20%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 30%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 40%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 50%; еще более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 50%; и наиболее предпочтительно, снижается по меньшей мере на 75%. Скорость роста опухоли может быть определена с помощью любых воспроизводимых способов определения. Скорость роста опухоли может быть определена в соответствии с изменением диаметра опухоли за единицу времени.

Лечение онкологического заболевания может приводить к сокращению возобновления роста опухоли. Предпочтительно, после лечения возобновление роста опухоли составляет менее чем 5%; более предпочтительно, возобновление роста опухоли составляет менее чем 10%; более предпочтительно, менее чем 20%; более



предпочтительно, менее чем 30%; более предпочтительно, менее чем 40%; более предпочтительно, менее чем 50%; еще более предпочтительно, менее чем 50%; и наиболее предпочтительно, менее чем 75%. Возобновление роста опухоли может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов определения. Возобновление роста опухоли определяют, например, путем определения увеличения диаметра опухоли после предшествующего сокращения опухоли после лечения. Сокращение возобновления роста опухоли определяется неспособностью опухолей возникать снова после прекращения лечения.

Лечение или предупреждение нарушения, связанного с клеточной пролиферацией, может приводить к снижению скорости клеточной пролиферации. Предпочтительно, после лечения скорость клеточной пролиферации снижается по меньшей мере на 5%; более предпочтительно, по меньшей мере на 10%; более предпочтительно, по меньшей мере на 20%; более предпочтительно, по меньшей мере на 30%; более предпочтительно, по меньшей мере на 40%; более предпочтительно, по меньшей мере на 50%; еще более предпочтительно, по меньшей мере на 50%; и наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 75%. Скорость клеточной пролиферации может быть определена с помощью любых воспроизводимых способов определения. Скорость клеточной пролиферации определяется, например, путем определения количества делящихся клеток в образце ткани за единицу времени.

Лечение или предупреждение нарушения, связанного с клеточной пролиферацией, может приводить к уменьшению доли пролиферирующих клеток. Предпочтительно, после лечения доля пролиферирующих клеток уменьшается по меньшей мере на 5%; более предпочтительно, по меньшей мере на 10%; более предпочтительно, по меньшей мере на 20%; более предпочтительно, по меньшей мере на 30%; более предпочтительно, по меньшей мере на 40%; более предпочтительно, по меньшей мере на 50%; еще более предпочтительно, по меньшей мере на 50%; и наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 75%. Доля пролиферирующих клеток может быть определена с помощью любых воспроизводимых способов определения. Предпочтительно, доля пролиферирующих клеток определяется, например, путем подсчета количества делящихся клеток относительно количества неделящихся клеток в образце ткани. Доля пролиферирующих клеток может равняться митотическому индексу.

Лечение или предупреждение нарушения, связанного с клеточной

пролиферацией, может приводить к уменьшению размера площади или зоны клеточной пролиферации. Предпочтительно, после лечения размер площади или зоны клеточной пролиферации уменьшается по меньшей мере на 5% относительно ее размера до лечения; более предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 10%; более предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 20%; более предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 30%; более предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 40%; более предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 50%; еще более предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 50%; и наиболее предпочтительно, уменьшается по меньшей мере на 75%. Размер площади или зоны клеточной пролиферации может быть определен с помощью любых воспроизводимых способов определения. Размер площади или зоны клеточной пролиферации может быть определен как диаметр или ширина площади или зоны клеточной пролиферации.

Лечение или предупреждение нарушения, связанного с клеточной пролиферацией, может приводить к уменьшению количества или доли клеток с аномальным внешним видом или морфологией. Предпочтительно, после лечения количество клеток с аномальной морфологией снижается по меньшей мере на 5% относительно его значения до лечения; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 10%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 20%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 30%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 40%; более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 50%; еще более предпочтительно, снижается по меньшей мере на 50%; и наиболее предпочтительно, снижается по меньшей мере на 75%. Аномальный внешний вид или морфология клеток могут быть определены с помощью любых воспроизводимых способов определения. Аномальная морфология клеток может быть определена с помощью микроскопии, например, с применением инвертированного микроскопа для изучения тканевых культур. Аномальная морфология клеток может быть выражена в виде ядерного плейоморфизма.

В контексте настоящего документа термин “избирательно” означает склонность возникать с большей частотой в одной популяции, чем в другой популяции. Сравнимые популяции могут представлять собой популяции клеток. Предпочтительно, соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль или сольват действуют избирательно в отношении опухолевой или предопухолевой клетки, но не в отношении нормальной клетки. Предпочтительно,

соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль или сольват действует избирательно с целью модулирования одной молекулярной мишени (например, метилтрансферазы в качестве белка-мишени), но не приводит к существенному модулированию другой молекулярной мишени (например, не являющейся белком-мишенью метилтрансферазы). Настоящее изобретение также предусматривает способ избирательного ингибирования активности фермента, такого как метилтрансфераза. Предпочтительно, событие проявляется селективно в популяции А относительно популяции В, если оно происходит более чем в два раза чаще в популяции А, по сравнению с популяцией В. Событие проявляется избирательно, если оно происходит более чем в пять раз чаще в популяции А. Событие проявляется селективно, если оно происходит более чем в десять раз чаще в популяции А; более предпочтительно, более чем в пятьдесят раз; еще более предпочтительно, более чем в 100 раз; и наиболее предпочтительно, более чем в 1000 раз чаще в популяции А, по сравнению с популяцией В. Например, будет считаться, что клеточная гибель в раковых клетках проявляется избирательно, если она происходит более чем в два раза чаще в раковых клетках, по сравнению с нормальными клетками.

Композиция по настоящему изобретению, например, соединение 44 или его фармацевтически приемлемая соль, и одно или несколько других терапевтических средств, таких как преднизон, могут модулировать активность молекулярной мишени (например, метилтрансферазы в качестве белка-мишени). Модулирование относится к стимулированию или ингибированию активности молекулярной мишени. Предпочтительно, соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, модулирует активность молекулярной мишени, если он(она) стимулирует или ингибирует активность молекулярной мишени по меньшей мере в 2 раза сильнее относительно активности молекулярной мишени при тех же состояниях, но в отсутствие лишь указанного соединения. Более предпочтительно, соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, модулирует активности молекулярной мишени, если он(она) стимулирует или ингибирует активность молекулярной мишени по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз сильнее относительно активности молекулярной мишени при тех же состояниях, но в отсутствие лишь указанного соединения. Активность молекулярной мишени может быть определена с помощью любых воспроизводимых

способов. Активность молекулярной мишени может быть определена *in vitro* или *in vivo*. Например, активность молекулярной мишени может быть определена *in vitro* с помощью анализа ферментативной активности или анализа связывания ДНК или активность молекулярной мишени может быть определена *in vivo* с помощью анализа экспрессии репортерного гена.

Композиция по настоящему изобретению не приводит к значительному модулированию активности молекулярной мишени, если добавление соединения не приводит к стимуляции или ингибированию активности молекулярной мишени более чем на 10% относительно активности молекулярной мишени при тех же состояниях, но в отсутствие лишь указанного соединения.

В контексте настоящего документа термин “избирательность в отношении изофермента” означает предпочтительное ингибирование или стимуляцию первой изоформы фермента по сравнению со второй изоформой фермента (например, предпочтительное ингибирование или стимуляцию изоформы метилтрансферазы альфа по сравнению с изоформой метилтрансферазы бета). Предпочтительно, соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль или сольват характеризуется минимум четырехкратным различием, предпочтительно, десятикратным различием, более предпочтительно, пятидесятикратным различием в отношении дозировки, требуемой для достижения биологического эффекта. Предпочтительно, соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, характеризуется этим отличием во всем диапазоне ингибирования, и примером указанного различия является значение  $IC_{50}$ , т. е. 50% ингибирование молекулярной мишени, представляющей интерес.

Введение композиции по настоящему изобретению в клетку или нуждающемуся субъекту может приводить к модулированию (т. е. стимуляции или ингибированию) активности метилтрансферазы, представляющей интерес.

Введение соединения по настоящему изобретению, например, композиции, содержащей соединение 44 или его фармацевтически приемлемую соль, и одного или нескольких других терапевтических средств, таких как преднизон, в клетку или нуждающемуся субъекту, приводит к модулированию (т. е., стимуляции или ингибированию) активности внутриклеточной мишени (например, субстрата). Подвергать модулированию с помощью соединения по настоящему изобретению можно несколько внутриклеточных мишеней, в том числе без ограничения,

метилтрансферазу.

Активирование относится к приведению композиции по настоящему изобретению (например, белка или нуклеиновой кислоты) в состояние, подходящее для осуществления требуемой биологической функции. Композиция по настоящему изобретению, способная активироваться, также может находиться в неактивированном состоянии. Активированная композиция по настоящему изобретению может характеризоваться ингибиторной или стимулирующей биологической функцией или и той, и другой. Повышение относится к увеличению требуемой биологической активности композиции по настоящему изобретению (например, белка или нуклеиновой кислоты). Повышение может происходить за счет увеличения концентрации композиции по настоящему изобретению.

В контексте настоящего документа “сигнальный путь регуляции контрольных точек клеточного цикла” относится к биохимическому пути, вовлеченному в модулирование контрольных точек клеточного цикла. Сигнальный путь регуляции контрольных точек клеточного цикла может оказывать стимулирующие или ингибирующие эффекты или и те, и другие, в отношении одной или нескольких функций, включающих контрольные точки клеточного цикла. Сигнальный путь регуляции контрольных точек клеточного цикла предусматривает по меньшей мере две композиции по настоящему изобретению, предпочтительно белков, обе из которых способствуют модулированию контрольных точек клеточного цикла. Сигнальный путь регуляции контрольных точек клеточного цикла может быть активирован за счет активации одного или нескольких участников сигнального пути регуляции контрольных точек клеточного цикла. Предпочтительно, сигнальный путь регуляции контрольных точек клеточного цикла представляет собой биохимический сигнальный путь.

В контексте настоящего документа “регулятор контрольных точек клеточного цикла” относится к композиции веществ, которые могут действовать, по меньшей мере частично, с целью модулирования контрольных точек клеточного цикла. Регулятор контрольных точек клеточного цикла может оказывать стимулирующие или ингибиторные эффекты, или и те, и другие, в отношении одной или нескольких функций, включающих контрольные точки клеточного цикла. Регулятор контрольных точек клеточного цикла может являться белком или не являться белком.

Лечение онкологического заболевания или нарушения, связанного с клеточной

пролиферацией, может приводить к клеточной гибели, и предпочтительно, клеточная гибель приводит к уменьшению количества клеток в популяции по меньшей мере на 10%. Более предпочтительно, клеточная гибель означает уменьшение по меньшей мере на 20%; более предпочтительно, уменьшение по меньшей мере на 30%; более предпочтительно, уменьшение по меньшей мере на 40%; более предпочтительно, уменьшение по меньшей мере на 50%; наиболее предпочтительно, уменьшение по меньшей мере на 75%. Количество клеток в популяции может быть определено с помощью любых воспроизводимых способов. Количество клеток в популяции может быть определено с помощью метода сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), иммунофлуоресцентной микроскопии и световой микроскопии. Способы определения клеточной гибели приведены в Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(5): 2674-8, 2003. Согласно одному аспекту клеточная гибель происходит в результате апоптоза.

Предпочтительно, эффективное количество композиции по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата не является значительно цитотоксичным для нормальных клеток. Терапевтически эффективное количество соединения не является существенно цитотоксичным для нормальных клеток, если введение соединения в терапевтически эффективном количестве не индуцирует клеточную гибель более 10% нормальных клеток. Терапевтически эффективное количество соединения существенно не влияет на жизнеспособность нормальных клеток, если введение соединения в терапевтически эффективном количестве не индуцирует клеточную гибель более 10% нормальных клеток. Согласно одному аспекту клеточная гибель происходит в результате апоптоза.

Приведение клетки в контакт с композицией по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом может избирательно индуцировать или активировать клеточную гибель в раковых клетках. Введение нуждающемуся субъекту соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата может избирательно индуцировать или активировать клеточную гибель в раковых клетках. Приведение клетки в контакт с композицией по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом может избирательно индуцировать клеточную гибель среди одного или нескольких типов клеток, пораженных в результате нарушения, связанного с клеточной пролиферацией. Предпочтительно, введение нуждающемуся субъекту композиции по

настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата избирательно индуцирует клеточную гибель среди одного или нескольких типов клеток, пораженных в результате нарушения, связанного с клеточной пролиферацией.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения онкологического заболевания путем введения нуждающемуся субъекту композиции по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, при этом введение композиции по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата приводит к одному или нескольким из следующего: предупреждению пролиферации раковых клеток путем удерживания клеток в одной или нескольких фазах клеточного цикла (например, G1, G1/S, G2/M) или индуцирования старения клеток, или активации дифференциации опухолевых клеток; активации клеточной гибели раковых клеток за счет цитотоксичности, некроза или апоптоза, не сопровождающейся значительной степенью клеточной гибели нормальных клеток; противоопухолевой активности у животных с терапевтическим индексом по меньшей мере 2. В контексте настоящего документа “терапевтический индекс” представляет собой результат деления максимальной переносимой дозы на эффективную дозу.

Специалист в данной области может обратиться к общим текстам ссылок за подробными описаниями известных техник, которые обсуждались в данном документе или аналогичных методиках. Эти тексты включают Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna *et al.*, *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18<sup>th</sup> edition (1990). Разумеется, на эти тексты можно также ссылаться при создании или применении аспекта по настоящему изобретению.

### **Пример 1.**

#### **Синергическая противоопухолевая активность ингибиторов EZH2 и глюкокортикоида**

Соединение 44 синтезировали как описано в патенте США № 8410088, полное содержание которого включено в данный документ с помощью ссылки.

Очень сильный синергетический эффект наблюдался при комбинации

соединения 44 (Cpd 44) только с агонистом глюкокортикоидного рецептора (GRag) преднизолоном, в качестве компонента СНОР, или с другим GRag, таким как дексаметазон. При комбинации с компонентом СНОР, антипролиферативные эффекты соединения 44 значительно увеличивались, и большая часть этого синергического эффекта приписывалась GRag преднизолону в качестве компонента СНОР (активному метаболиту преднизона). Примечательно, что комбинация соединения 44 и преднизолона расширяла диапазон клеток, восприимчивых к ингибированию EZH2, от клеток, только несущих мутацию, до всех клеток GCB NHL.

Две клеточные линии с мутантным EZH2, WSU-DLCL2 и SU-DHL10, предварительно обрабатывали соединением 44 в течение 4 дней, а затем совместно обрабатывали комбинацией соединения 44 и отдельных компонентов СНОР в течение дополнительных 3 дней (модель 4+3). Для каждого из мафосфамида (аналог циклофосфамида), доксорубицина и винкристина было показано зависимое от концентрации ингибирование роста в мутантных клеточных линиях. Таким образом, для данных лекарственных средств в комбинации с соединением 44 получали показатели аддитивности (CI, рассчитанный с применением программного обеспечения Calcsyn). Тем не менее, для данных клеточных линий не было показано чувствительности к преднизолону (активному метаболиту преднизона) отдельно. Таким образом, определение CI было невозможным, и вместо этого рассчитывали эффективность исходя из сдвига IC<sub>50</sub> соединения 44, наблюдаемого по кривой «доза-ответ» для преднизолона.

Комбинация соединения 44 и мафосфамида приводило к общей дополнительной эффективности комбинации в обеих клеточных линиях с мутантным EZH2 (Фигура 1C, 1F). В клетках WSU-DLCL2 комбинация соединения 44 и доксорубицина приводила к синергическому действию в модели 4+3 (Фигура 1A), в то время как в клетках SU-DHL10 эта комбинация была аддитивной (Фигура 1D). Для комбинации соединения 44 и винкристина также была продемонстрирована аддитивность в обеих клеточных линиях с мутантным EZH2 (Фигура 1B, 1E). При обработке клеток WSU-DLCL2 комбинацией преднизолона и соединения 44, наблюдали 9-кратный сдвиг в сторону большей эффективности для соединения 44. Обработка другим GRag, дексаметазоном, приводила к еще большему сдвигу IC<sub>50</sub> для соединения 44, которое являлось 17-кратным (Фигура 2A, 2B). Аналогичная тенденция в отношении сдвига эффективности для соединения 44 наблюдалась в клетках SU-DHL10 (Фигура 2C, 2D).



Исследовали, может ли эффект комбинации соединения 44 и компонента СНОР воспроизводиться в случае клеточных линий лимфомы с *EZH2* дикого типа, чувствительных к соединению 44. Поскольку обработка соединением 44 отдельно не индуцировала ингибирование роста в клеточных линиях лимфомы с *EZH2* дикого типа, сдвиги эффективности рассчитывали исходя из кривых «доза-ответ» для отдельных компонентов СНОР. Из четырех исследованных компонентов СНОР, только комбинация GRag и соединения 44 приводила к сдвигу эффективности в клеточной линии лимфомы GCB дикого типа.

Исследовали, может ли эффект комбинации соединения 44 и компонента СНОР воспроизводиться в случае клеточных линий с мутантным *EZH2* и клеточных линий дикого типа, WSU-DLCL2 с мутантным *EZH2* (Фигура 3А, 3В) и клеточных линий GCB лимфомы DONH2 с *EZH2* дикого типа (Фигура 3С, 3D), чувствительных к соединению 44. Обработка клеток WSU-DLCL2 комбинацией преднизолона и соединения 44 вызывала повышение активности соединения 44 (Фигура 3А), с максимальным 24-кратным снижением значения  $IC_{50}$  для соединения 44. Обработка другим GRag, дексаметазоном, приводила к еще большему, 30 кратному снижению значения  $IC_{50}$  для соединения 44 (Фигура 3В). При биологически значимых концентрациях, составляющих 1 мкМ для преднизолона и 100 нМ для дексаметазона, повышение эффективности было 7-кратным и 15-кратным соответственно. Для соединения 44 в качестве единственного средства не был показан антипролиферативный эффект в клетках DONH2 с *EZH2* дикого типа (Фигура 3С, 3D), таким образом определяли сдвиг эффективности в сторону преднизолона или дексаметазона. Интересно, что при исследовании соединения 44 в клеточной линии GCB лимфомы (DONH2), только GRag компонент СНОР продемонстрировал повышенную эффективность в присутствии соединения 44 (Фигура 3С, 3D). Эффективность преднизолона или дексаметазона была повышена с добавлением соединения 44 в клетки DONH2 (Фигура 3С, 3D).

С учетом того, что только комбинация GRag и *EZH2i* в значительной степени индуцировала антипролиферативные эффекты, по сравнению с любым отдельным средством, в клеточных линиях GCB лимфомы с мутантным *EZH2* и дикого типа, определяли, влияет ли продолжительность обработки и/или последовательность добавления соединений на чувствительность. Панель клеточных линий была расширена с включением клеточной линии с *EZH2* дикого типа, с мутантным *EZH2*, чувствительной к соединению 44 и клеточной линии с мутантным *EZH2*,

нечувствительной к соединению 44 (ранее описана McCabe et al, и неопубликованные внутренние данные). В предыдущей модели 4+3, сдвиг эффективности был обусловлен воздействием или соединения 44 (в чувствительных клеточных линиях с мутантным по Y646 EZH2 (также известна как Y641)), или преднизолона (клеточные линии EZH2 WT). В случае этой серии экспериментов, сдвиг значения  $IC_{50}$  для соединения 44 при фиксированной концентрации преднизолона применяли для определения эффективности комбинации в клеточных линиях, обрабатываемых согласно модели 4+3, совместной обработке в течение 4 дней или 7 дней, или обработке преднизолоном в течение 4 дней с совместной обработкой в течение 3 дней. В случае совместной обработки чувствительных к соединению 44 клеточных линий с мутантным EZH2 в течение 4 дней, для соединения 44 наблюдали 30-60-кратное снижение значения  $IC_{50}$ , что демонстрировало тенденции, аналогичные для схемы обработки 4+3 (Таблица 1). Аналогичные результаты наблюдали в случае совместной обработки в течение 7 дней и модели 4+3 (Таблица 1). В клеточных линиях GCB с EZH2 дикого типа, не смотря на отсутствие измеримого  $IC_{50}$  для соединения 44 спустя 4 дня, обе клеточные линии характеризовались сниженным уровнем пролиферации и измеримым  $IC_{50}$  для соединения 44 спустя 4 дня совместной обработки преднизолоном (Таблица 1). Для клеток GCB с EZH2 дикого типа также наблюдался ответ в случае модели 4+3 и/или в случае схем совместной обработки в течение 7 дней (Таблица 1). Удивительно, что для нечувствительных к соединению 44 клеточных линий с мутантным EZH2, которые также характеризовались неопределяемым значением  $IC_{50}$  для соединения 44 после обработки в течение 4 дней, был продемонстрирован сниженный уровень пролиферации в случае совместной обработки в течение 4 дней, с еще более сильным ответом на комбинацию в случае схемы обработки 4+3, также как в случае совместной обработки в течение 7 дней (Таблица 1). Только для одной из клеточных линий была продемонстрирована эффективность комбинации, в случае когда клетки были предварительно обработаны преднизолоном, затем совместно обработаны соединением 44 и преднизолоном, из чего можно предположить, что порядок добавления лекарственного средства важен для синергического ответа (Таблица 1).

Таблица 1. Комбинация соединения 44/GRag способствует повышению чувствительности к EZH2i в клеточных линиях EZH2 Y646 (Y641) и решает проблему нечувствительности к EZH2i в устойчивых к EZH2i клеточных линиях.

Клеточная линия	4 дня Cpд44 IC <sub>50</sub> (мкМ)		7 дней Cpд44 IC <sub>50</sub> (мкМ)		
	Cpd44 отдельно	Cpd44 совместная обработка	4 дня Cpд44 предварительной/3 дня совместной обработки	4 дня Pred предварительной/3 дня совместной обработки	7 дней совместной обработки
WSU (Y646-Sens)	0,53 +/-0,014	0,020+/-0,021	0,011+/-0,0062	>1	0,014+/-0,0049
SU-DHL10 (Y646-Sens)	0,64+/-0,26	0,0092+/-0,0044	0,0027+/-0,0013	0,52>1	0,020+/-0,0057
RL (Y646-Res)	>1	0,0096+/-0,0066	<<0,004	0,38	<0,004
SU-DHL4 (Y646-Res)	>1	>1, 0,2 >1	0,035+/-0,043	>1	0,51+/-0,35
DOHH2 (WT)	>1	0,20+/-0,25	>1, 0,03, >1	>1	0,34+/-0,078
OCI-Ly19 (WT)	>1	0,19+/-0,11	0,0055+/-0,0047	>1	0,026, <0,004

Для оценки потенциальных механизмов, ответственных за наблюдаемую эффективность комбинации соединения 44 и GRag в данных клеточных линиях, определяли, влияет ли обработка преднизолоном на общее метилирование и ацетилирование H3K27 после обработки в течение четырех дней или отдельно, или в комбинации с соединением 44 в клетках WSU-DLCL2, OCI-LY19 и RL (два независимых эксперимента). Преднизолон в качестве отдельного средства не оказывал эффект в отношении уровней H3K27Me3 в клетках WSU-DLCL2 или RL, но в более высоких дозах повышал уровни H3K27Me3 в клетках OCI-LY19 (Фигура 9А). В связи с высокой чувствительностью клеток OCI-LY19 к преднизолону, в отличие от нечувствительных к преднизолону клеточных линий с мутантным EZH2, для обработки клеток OCI-LY19 требовалась более низкая доза преднизолона. Включение преднизолона не меняет значение IC<sub>50</sub> для соединения 44 для ингибирования H3K27Me3 в какой-либо клеточной линии (Фигура 9А). Подобным образом, уровни общего ацетилирования H3K27 не подвергались воздействию преднизолона отдельно или при комбинации соединения 44 и преднизолона (Фигура 9В, 9С и 9D).

Поскольку было обнаружено, что общие уровни ацетилирования или триметилирования H3K27 не были затронуты, изучали регуляцию транскрипции в рамках сигнальных путей с участием GR. Клетки WSU-DLCL2, SU-DHL10, RL, SU-DHL4, OCI-LY19 и DOHH2 обрабатывали соединением 44, преднизолоном в одной концентрации или комбинацией в течение 4 дней и анализировали генную экспрессию с применением анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с

применением PCR (Таблица 4). В целом, в случае преднизолона и комбинированной обработке большинство генов были подвержены отрицательной регуляции во всех клеточных линиях, что указывало на роль GR как активатора, так и репрессора генной экспрессии. В данном случае, внимание уделялось активирующей функции GR, и описывали 3 гена, результатом положительной регуляции которых был синергический эффект для панели клеточных линий в случае комбинированной обработки. Sestrin (*SESNI*), предполагаемый онкосупрессор, который ингибирует передачу сигнала mTOR (ref), был определен как ген, главным образом характеризующийся повышенной экспрессией в 4 клеточных линиях с мутантным EZH2 в результате синергического действия, при комбинированной обработке, но не в клеточных линиях с EZH2 дикого типа (Фигура 8А и Таблица 2). Экспрессия TNF была повышена в результате синергического действия только в одной из двух нечувствительных к соединению 44 клеточных линий с мутантным *EZH2* (SUDHL4), с тенденцией к аналогичному результату для другой нечувствительной к соединению 44 клеточной линии с мутантным *EZH2* (RL) (Фигура 8В и Таблица 2). Хотя экспрессия *TSC22D3/GILZ* была повышена с помощью преднизолона во всех клеточных линиях, только указанная экспрессия была усилена в результате синергического действия за счет комбинированной обработки в чувствительных к соединению 44 клетках с мутантным *EZH2* (Фигура 8С и Таблица 2).

Таблица 2: Статистический анализ данных по генной экспрессии, приведенных на Фигуре 8.

Клеточная линия	Сравнение	<i>Sestrin</i>		<i>TNF</i>		<i>GILZ</i>	
		<i>P</i> -значение	Обобщенное <i>P</i> -значение	<i>P</i> -значение	Обобщенное <i>P</i> -значение	<i>P</i> -значение	Обобщенное <i>P</i> -значение
OCI-LY19	DMSO в сравнении с комбинацией	0,9164	ns	0,0071	**	0,0075	**
OCI-LY19	EPZ-6438 в сравнении с комбинацией	0,3232	ns	0,1553	ns	0,0326	*
OCI-LY19	преднизолон в сравнении с комбинацией	0,1486	ns	0,5050	ns	0,6353	ns
DOHH2	DMSO в сравнении с комбинацией	0,0063	**	0,0589	ns	0,0056	**
DOHH2	EPZ-6438 в сравнении с комбинацией	0,0186	*	0,1401	ns	0,0071	**
DOHH2	преднизолон в сравнении с комбинацией	0,557	ns	0,1000	ns	0,2828	ns
WSU-DLCL2	DMSO в сравнении с комбинацией	<0,0001	****	0,0001	***	<0,0001	****
WSU-DLCL2	EPZ-6438 в сравнении с комбинацией	<0,0001	****	0,3813	ns	<0,0001	****
WSU-DLCL2	преднизолон в сравнении с комбинацией	<0,0001	****	0,9483	ns	0,0001	***
SUDHL10	DMSO в сравнении с комбинацией	0,0073	**	0,0058	**	0,0102	*
SUDHL10	EPZ-6438 в сравнении с комбинацией	0,0081	**	0,0050	**	0,0076	**

SUDHL10	преднизолон в сравнении с комбинацией	0,0126	*	0,1159	ns	0,0236	*
RL	DMSO в сравнении с комбинацией	0,0449	*	0,0529	ns	0,0623	ns
RL	EPZ-6438 в сравнении с комбинацией	0,0484	*	0,0639	ns	0,0635	ns
RL	преднизолон в сравнении с комбинацией	0,2329	ns	0,0997	ns	0,5716	ns
SUDHL4	DMSO в сравнении с комбинацией	0,0033	**	0,0043	**	0,0275	*
SUDHL4	EPZ-6438 в сравнении с комбинацией	0,0045	**	0,0059	**	0,0196	*
SUDHL4	преднизолон в сравнении с комбинацией	0,010	*	0,0205	*	0,0107	ns

Попарные статистические сравнения осуществляли с применением двустороннего *t*-теста.

ns: незначимый; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Уровни экспрессии глюкокортикоидного рецептора, нормализованные относительно контролей DMSO, для клеточных линий с *EZH2* дикого типа (т. е., OCI-LY19, DONH2), *EZH2* Y646-чувствительных (т. е., WSU-DLCL2, SUDHL10), и *EZH2* Y646-устойчивых (т. е., RL, SUDHL4) определяли после обработки указанным соединением 44, преднизолоном, комбинацией соединения 44 и преднизолона, или DMSO (в 2 повторах, более подробно см. описание материалов и способов в разделе 5). Как показали результаты, уровни экспрессии глюкокортикоидных рецепторов не подвергались воздействию в клеточных линиях при комбинации. (Фигура 19) Кратность изменения значений рассчитывали с применением способа  $\Delta\Delta Ct$  и *ACTB*, *B2M* и *GAPDH* в качестве референтных генов.

Затем изучали эффекты в результате исключения одного или всех химиотерапевтических компонентов схемы CHOP в двух дополнительных исследованиях с ксенотрансплантатами. Мышей с ксенотрансплантатом SUDHL10 (*EZH2* Y646F) обрабатывали соединением 44, COP (химиотерапия без доксорубицина в качестве компонента) или их комбинацией в течение 28 дней (Фигура 20A). Сравнивали средние значения веса опухоли для 8/16 мышей, умерщвленных на 28 день, при этом были продемонстрированы значимые различия в весе опухоли между группами (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; двусторонний  $t$  тест). Для мышей, обрабатываемых соединением 44 в максимальной переносимой дозе или комбинацией соединения 44/COP, было показано 100% выживание на 60 день, для группы с комбинацией были показаны наименьшие значения веса опухоли на 28 день, со статистической разницей ( $p < 0,05$ ) относительно других групп лечения, в том числе с максимальной переносимой дозой для соединения 44 (Фигура 20A).

Далее исследовали комбинацию дозировки соединения 44 с преднизолоном в течение 28 дней на ксенотрансплантатной модели SUDHL10 для двух доз соединения 44 или преднизона в случае двух разных схем (Pred-1 = преднизон при 0,15 мг/кг BID x 5 в дни 1-5 и 22-26; Pred-2 = преднизон 0,15 мг/кг BID x 28). In vitro данные свидетельствовали о том, что преднизон в определенной дозировке отдельно не индуцировал какой-либо значительный противоопухолевый эффект (Фигура 20B). Согласно предыдущему исследованию, введение соединения 44 в дозе 125 мг/кг BID (дважды в сутки) давало только частичный ответ, а совместное введение соединения 44 с преднизолоном в дозе 0,15 мг/кг BID, но не в случае схемы с 2 циклами введения преднизона, индуцировало максимально возможную регрессию, достигаемую при

более высоких дозах соединения 44 отдельно. Вес тела всех мышей, получающих дозу препарата, приведен на Фигуре 20С.

Мышей с ксенотрансплантатом SUDHL10 (EZH2 Y646F) обрабатывали соединением 44, COP (химиотерапия без доксорубина в качестве компонента) или их комбинацией в течение 28 дней, как описано в способах. Сравнивали средние значения веса опухоли для 8/16 мышей, умерщвленных на 28 день, при этом были продемонстрированы значимые различия в весе опухоли между группами (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; двусторонний  $t$  тест). **В)** Мышей с ксенотрансплантатом SUDHL10 (EZH2 Y646F) в течение 28 дней обрабатывали с применением двух доз соединения 44 или преднизона по двум разным схемам (Pred-1 = преднизон при 0,15 мг/кг BID x 5 в дни 1-5 и 22-26; Pred-2 = преднизон 0,15 мг/кг BID x 28). Оба соединения также вводили в комбинации, как было указано ранее. Средние значения объема опухоли  $\pm$  SEM ( $n=10$ ) приведены в виде графика в верхней части рисунка. Для всех групп, которым вводили EPZ-6438, было показано статистически значимое сокращение роста опухоли ( $p < 0,01$  по меньшей мере в сравнении с носителем или преднизолом в качестве отдельного средства для обеих схем; ANOVA с повторными измерениями, апостериорный тест Даннетта), в то время как преднизон в качестве отдельного средства не вызывал какой-либо значительный противоопухолевый эффект в сравнении с носителем.

Таблица 3. Перечень комбинаций с соединением 44

	Клеточные линии						
	GCB с мутантным EZH2			GCB с EZH2 дикого типа			
	WSU-DLCL2	SU-DHL10	SU-DHL6	DOHH2	SU-DHL5	OCI-LY-19	Toledo
<b>С</b> мафосфамид	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Эффект отсутствует	--	--	Эффект отсутствует
<b>Н</b> доксорубин	Синергический эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Эффект отсутствует	--	--	Эффект отсутствует
<b>О</b> винкристин	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Аддитивный эффект	Эффект отсутствует	--	--	Эффект отсутствует
<b>Р</b> преднизолон	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Эффект отсутствует
Дексаметазон	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Синергический эффект	Эффект отсутствует

Наконец, ингибирование роста опухоли оценивали в 3 разных ксенотрансплантатных моделях лимфомы с мутантным EZH2. SCID или «голым»



мышам с подкожными ксенотрансплантатами лимфомы совместно вводили дозу соединения 44 и компонента химиотерапии, или CHOP, или COP (CHOP без доксорубицина), и сравнивали с вариантами обработки отдельным средством. У мышей с ксенотрансплантатом WSU-DLCL2 ингибирование роста опухоли достигалось при всех используемых дозах и схемах введения соединения 44, и оно было более эффективным, чем в случае химиотерапии CHOP отдельно (Фигура 7А). Кроме того, комбинированная терапия с применением соединения 44 и CHOP индуцировала более устойчивый противоопухолевый ответ и более эффективное значимое ( $p < 0,001$ ) ингибирование роста опухоли (93%), чем в случае одного отдельного средства (45% и 71%, для CHOP и соединения 44 соответственно). Все варианты обработки отдельным средством были переносимыми; незначительная потеря веса тела (11,3 %) имела место в группе с комбинацией соединения 44/CHOP после первого цикла, после чего мыши возвращались в исходное состояние до следующего цикла лечения.

В ксенотрансплантатной модели SU-DHL6 не наблюдали значительного ингибирования роста опухоли для CHOP отдельно или для соединения 44 (Фигура 7В, верхняя панель), в отличие от результатов, ранее опубликованных Veguelin и др. с применением ингибитора EZH2 GSK503. Удивительно, что комбинация соединения 44/CHOP приводила к регрессии опухоли. В случае, когда введение дозы прекращали на 28 день, и у мышей за период 60 дней наблюдали задержку роста опухоли, данная комбинация приводила к безопухолевой выживаемости у 58% мышей (Фигура 7В, нижняя панель).

Доксорубицин в качестве компонента CHOP в отношении продолжительности жизни характеризуется пределом суммарной дозы, составляющей  $< 550 \text{ мг/м}^2$ , в связи с его кардиотоксичностью. Таким образом, исследовали эффективность комбинации соединения 44/программа химиотерапии с исключением данного компонента. В третьем исследовании мышей с ксенотрансплантатом SU-DHL10 обрабатывали в течение 28 дней с применением соединения 44 (BID), программы химиотерапии без доксорубицина (COP) с повышением доз, или комбинации COP и соединения 44. Ингибирование роста опухоли наблюдали при всех дозах соединения 44, а также для COP (Фигура 7С, верхняя панель). Комбинированные обработки с помощью 266 мг/кг, 532 мг/кг и COP/соединение 44 приводили к регрессии со статистической разницей относительно носителя ( $p > 0,001$ ), оцененной с помощью ANOVA с повторными измерениями и апостериорного теста Даннетта, при этом для группы с комбинацией

44/COP был продемонстрирован наилучший общий ответ. Спустя 28 дней введения доз подгруппу мышей с наименьшей опухолевой массой (8 мышей в группе) сохраняли живыми без дополнительного введения доз до конечной точки задержки роста опухоли. Имел место очевидный зависимый от дозы эффект в отношении задержки роста опухоли у мышей, обрабатываемых соединением 44, в то время как опухоли, обрабатываемые COP, прогрессировали быстрее опухолей, обрабатываемых соединением 44 (Фигура 7С, средняя панель). Несмотря на то, что мыши, обработанные соединением 44 в максимальной переносимой дозе или комбинацией соединения 44/COP, показывали 100% выживание на 60 день, для группы с комбинацией были показаны наименьшие конечные значения веса опухоли, со статистической разницей ( $p > 0,05$ ) относительно других групп лечения, в том числе с максимальной переносимой дозой для соединения 44 (Фигура 7С, нижняя панель).

Стандартные виды лечения В-клеточной NHL представляют собой комбинацию программ химиотерапии, состоящих из циклофосфида, доксорубина, винкристина и преднизолона. Хотя процент пациентов с полным объективным ответом может достигать 40-50%, у значительной доли пациентов наблюдается рецидив, с 30% общей выживаемостью в течение 3 лет. Рецидивирующие лимфомы могут характеризоваться устойчивостью к широкому диапазону противоопухолевых средств, что с клинической точки зрения создает серьезную проблему в отношении борьбы с агрессивными злокачественными опухолями. Приобретение устойчивости к лекарственному средству при лимфоме частично обусловлено генетической гетерогенностью и нестабильностью опухолевых клеток. Таким образом, успешное лечение устойчивой к химиотерапии NHL требует рациональных комбинаций лекарственных средств, направленных на несколько сигнальных путей, специфичных в отношении подтипов В-клеточной NHL. Например, при лимфомах с активированным типом В-клеток в развитие устойчивости к терапии вовлечена конститутивная активация сигнального пути с участием NFkB, и было показано, что несколько видов целевой терапии являются перспективными в случае данного подтипа.

Эпигенетические эффекторы, такие как polycomb, также вовлечены в развитие устойчивости раковых клеток к химиотерапии. EZH2, каталитическая субъединица участвующего в репрессии транскрипции комплекса белков polycomb 2 (PRC2) является одним из важнейших онкогенных регуляторов при лимфомах, происходящих из В-клеток герминативного центра. Эти более примитивные злокачественные опухоли,

происходящие из В-клеток, в частности, варианты, экспрессирующие мутантные EZH2 с измененной каталитической активностью, требуют EZH2 для пролиферации и выживания. Результаты доклинических исследований прогнозируют значительные перспективы в отношении ингибиторов каталитической активности EZH2 для лечения генетически определенных онкологических заболеваний, а также ингибиторы EZH2 могут снижать устойчивость к химиотерапии. Представленные в настоящем документе данные показывают, что соединение 44, ингибитор EZH2 на клинической стадии, характеризуется различной степенью комбинационной эффективности, изменяясь от аддитивного до синергического эффекта, с учетом компонентов CHOP. В частности, данные комбинационные эффекты были обнаружены при лимфомах, происходящих из герминативного центра, и в случае циклофосфида, доксорубина и винкристина, ограничивались клетками с мутантным EZH2. Значительный синергический эффект в отношении уничтожения клеток лимфомы был обнаружен также при совместном введении дозы соединения 44 и CHOP *in vivo*. В частности, это было актуально для ксенотрансплантатной модели SU-DHL6, где ни одно отдельное средство не продемонстрировало противоопухолевую активность, а в результате комбинации индуцировалась продолжительная регрессия у >50% мышей. Это подтверждает потенциальное значение гиперактивного EZH2 в развитии устойчивости к химиотерапии при лимфоме с мутантным EZH2. Среди компонентов CHOP, в результате комбинации соединения 44 с преднизолоном индуцировалась наиболее сильная антипролиферативная активность, и эта комбинация также могла делать клеточные линии GCB лимфомы чувствительными к ингибированию EZH2, независимо от статуса мутации EZH2. Кроме того, эффективность комбинации была более очевидна, когда дозы соединения 44 и преднизолона вводили совместно или в определенной последовательности; таким образом, первичная обработка клеток ингибитором EZH2 с последующей обработкой агонистами GR оказалась особенно эффективной. Это неожиданное открытие характеризуется потенциально важными выводами в отношении применения ингибиторов EZH2 в клинике. Во-первых, широко используемые GRag часто вводят совместно с противоопухолевыми средствами для предупреждения индуцируемых лекарственным средством аллергических реакций, и ослабления боли, тошноты и рвоты, и они являются важными при лечении гематопоэтических злокачественных опухолей. По сравнению с другими компонентами CHOP, GRag индуцируют наименее серьезные побочные эффекты. Кроме того, данные

по ксенотрансплантатной модели SU-DHL10 свидетельствуют о том, что возможность исключения доксорубицина из программы CHOP с сохранением эффективности комбинации с соединением 44, могла бы избавить пациентов от побочных эффектов, связанных с дозолимитирующей кардиотоксичностью доксорубицина. Наконец, в доклинических исследованиях было показано, что ингибиторы EZH2 в качестве отдельного средства индуцируют значительную цитотоксичность только при лимфомах с мутантным EZH2, что составляют часть (20%) пациентов с GCB лимфомой с высокой неудовлетворенной клинической потребностью. Эти результаты демонстрируют, что комбинация GRag/ингибитор EZH2 может иметь клиническую ценность для всех видов лимфомы, происходящей из В-клеток герминативного центра.

Связанные с глюкокортикоидами молекулы GR перемещаются в ядро и могут действовать в качестве активатора или репрессора транскрипции, в зависимости от клеточных условий. Было предположено, что GR постоянно связан с нуклеосомой для продуктивного взаимодействия, и целью ферментов, модифицирующих хроматин, является обеспечение регулируемого доступа GR, его кофакторов и аппарата базальной транскрипции к ДНК. В других исследованиях было показано, что GR нередко связывается с уже существующими участками открытого хроматина, при этом структура хроматина организована таким образом, что в GR в клетках определенного типа может действовать тканеспецифично. Доступность сайтов связывания GR дополнительно может быть повышена за счет АТФ-зависимого ремоделирования хроматина, и в отношении данной активности ключевую роль играет комплекс SWI/SNF. Без привязки к какой-либо конкретной теории или специфичному механизму действия, можно предположить, что подавление активности хроматина, индуцируемое EZH2-опосредованным гипертриметилированием H3K27, может блокировать некоторые, с другой стороны доступные сайты связывания GR, что препятствует нормальной GR-опосредованной индукции или репрессии генов. Действительно, все клеточные линии лимфомы с мутантным EZH2 являются нечувствительными к лечению GRag, в то время как в клетках EZH2 дикого типа наблюдается зависимость от концентрации цитотоксичность. Наблюдение, что предварительная обработка преднизолоном, с последующей обработкой соединением 44, не способна индуцировать синергический эффект почти во всех исследуемых клеточных линиях, указывает на возможность ингибитора EZH2 индуцировать ремоделирование хроматина, будучи скоростью-лимитирующей стадией в отношении усиления действия

GR. Также известно, что PRC2 является антагонистом функции SWI/SNF, и снижение уровня экспрессии коровых субъединиц комплекса SWI/SNF — SMARCA4, ARID1A и INI1 — ассоциировано с устойчивостью острой лимфобластной Т-клеточной лейкемии к преднизолону. Поскольку при рабдоидной опухоли была установлена взаимосвязь снижения уровня INI1 и гиперактивации EZH2, исследовали, будут ли повышаться уровни общего белка INI1 в клетках различных типов лимфомы при воздействии на них соединением 44 или преднизолоном, с потенциальной возможностью большей доступности GR к его сайтам связывания после усиления функции SWI/SNF.

В анализе генной экспрессии компонентов сигнального пути GR было выявлено как повышение, так и снижение уровня генной экспрессии после обработки клеток нескольких типов лимфомы GCB (как с EZH2 дикого типа, так и с мутантным) соединением 44, преднизолоном или их комбинацией, что доказывает двойную функцию GR. Единственный ген, экспрессия которого была повышена в результате синергического действия за счет комбинации во всех клетках лимфомы с мутантным EZH2 был SESN1, онкосупрессор TP53, который функционирует в рамках клеточного ответа на повреждение ДНК и оксидативный стресс. Sestrins ингибируют клеточный рост путем активации AMP-активируемой протеинкиназы, что приводит к ингибированию сигнального пути mTOR. Поэтому SESN1-опосредованное ингибирование сигнального пути mTOR может представлять собой важный механизм восстановления чувствительности к GRag в клетках лимфомы с мутантным EZH2 после обработки соединением 44.

С другой стороны, комбинированная обработка GRag/соединение 44 также может индуцировать цитотоксичность в этих клеточных линиях лимфомы с мутантным EZH2, которая, как сообщалось, плохо поддается лечению ингибитором EZH2 (RL, SU-DHL4). В этих клеточных линиях SESN1 также индуцировался комбинированной обработкой, но дополнительно повышение уровня экспрессии TNF в результате синергического эффекта наблюдалось исключительно в клетках RL и SU-DHL4. Это наблюдение кажется удивительным, поскольку TNF и глюкокортикоиды, как правило, действуют антагонистически. TNF, через его рецептор TNFR-1, может индуцировать апоптоз, но также способен передавать сигналы, вовлеченные в выживание, главным образом через сигнальный путь NFkB. Таким образом, возможно, что повышенный уровень экспрессии TNF, индуцируемый действием комбинации соединение 44/преднизолон может смещать действие TNF в сторону апоптоза, в контексте

репрессии агонистом GR NFκB-опосредованной транскрипции. Тем не менее, все еще не ясно, почему данный механизм может приводить к синергической цитотоксичности в нечувствительных к соединению 44 клетках с мутантным EZH2. Потенциальное значение нарушения репрессии отрицательных регуляторов сигнального пути NFκB в развитии устойчивости к GRag и потенциальная роль опосредованного действия EZH2, что дополнительно подтверждается наблюдением, что уровень экспрессии GILZ повышен в результате синергического эффекта в 2 из 6 клеточных линий в случае комбинации.

### **Способы**

#### *Анализ с выделением в среду*

Клетки лимфомы высевали в колбы (50000 клеток/мл в случае WSU-DLCL2 и ДОНН2, 10000 клеток/мл в случае SU-DHL10 и 100000 клеток/мл в случае Toledo) и предварительно обрабатывали соединением 44 в 7 дозах или DMSO в течение 4 дней или 6 дней в случае анализов с Toledo. Затем клетки снова разделяли до 50000 клеток/мл в случае WSU-DLCL2 и ДОНН2 или 30000 клеток/мл в случае SU-DHL-10 и совместно обрабатывали соединением 44 и соединением, представляющим интерес, с применением цифрового дозатора HP D300 (Tecan). Для обоих лекарственных средств проводили серии двукратных разведений и объединяли при постоянном соотношении по диагонали планшета с DMSO с конечным содержанием 0,11% (об./об.). Спустя 3 дня совместной обработки (5 дней в случае анализов с Toledo), жизнеспособность клеток определяли по содержанию АТФ с применением CellTiter-Glo® (Promega), и люминесценцию детектировали с применением считывающего устройства для микропланшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices).

Количественное определение синергического эффекта для комбинации лекарственных средств осуществляли с помощью способа по Chou-Talalay (Ref 1). Уравнение для комбинаторного индекса (CI) дает количественное определение аддитивности (CI=1), синергизма (CI < 1) и антагонизма (CI > 1). В данном уравнении применяются значения для фракции подавления (Fa), исходя из постоянного соотношения комбинации лекарственных средств с целью определения значений CI. Полученный в результате график (Fa-CI) демонстрирует результирующие значения CI, охватывающие значения с доверительными интервалами 95%. Данные графики Fa-CI получали с применением программного обеспечения для Windows (Ref 2). Значения CI < 1 с доверительными интервалами, также менее 1 указывают на статистически

значимый синергический эффект.

Сдвиги эффективности определяли в случае комбинаций лекарственных средств, где только для одного лекарственного средства показано ингибирование, составляющее более чем 50%. Графики зависимости «доза-ответ» строили с применением Graphpad Prism, и по кривым «доза-ответ» путем интерполяции получали концентрации или с 50% или с 60% ингибирования. Сдвиги эффективности считали значимыми, если доверительные интервалы для дозозависимых ответов не перекрывались.

*Краткое изложение по клеточным линиям, соединениям и обработке*

WSU-DLCL2, SU-DHL10, RL, SU-DHL4, OCI-LY19 и DOHH2 были описаны ранее (NatChemBio 2012). Для исследований комбинаций применяли модифицированную авторами настоящего изобретения версию анализа пролиферации, описанного ранее (Daigle et al, Cancel Cell, Vol. 20, 1. Pg. 53-65 (2011); Daigle et al., Blood, 121, 13, 2533-2541 (2013)). Вкратце, на 0 день клетки в трех повторностях высевали в 96-луночные планшеты при исходных значениях плотности для обеспечения линейной фазы через 4 дня логарифмической фазы роста. Клетки обрабатывали или соединением 44 (начиная с верхней дозы 1 мкМ), одной дозой преднизолона (№ каталога и производитель) в концентрации, в 10 раз меньшей чем IC50 лекарственного средства на 4 день или комбинацией соединения 44 и преднизолона. На 4 день клетки считали с применением реагента Viacount на проточном цитометре guava easyCyte flow, и определенное количество живых клеток применяли для посева клеток при исходных плотностях для выращивания в течение 3 дополнительных дней. Клетки, предварительно обработанные соединением 44, непрерывно получали или соединение 44 отдельно, или комбинацию соединения 44 и преднизолона (стабильная доза); клетки, предварительно обработанные преднизолоном, непрерывно получали или преднизолон, или комбинацию преднизолона и соединения 44; клетки, обработанные совместно в течение 4 дней продолжали подвергаться совместной обработке в течение 7 дней.

*Исследования с ксенотрансплантатами*

Все процедуры в отношении обращения с животными, ухода и обработки в данном исследовании осуществляли согласно основным положениям, утвержденным институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) CRL Piedmont и Shanghai ChemPartner, следуя рекомендациям Международной

ассоциации по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AAALAC). Клетки WSU-DLCL2, SU-DHL6 или SU-DHL10 собирали во время середины логарифмической фазы роста и ресуспендировали в PBS с 50% Matrigel™ (BD Biosciences), а затем вводили мышам с ослабленным иммунитетом. Каждая мышь подкожно получала  $1 \times 10^7$  клеток (0,2 мл суспензии клеток) в правый бок, и как только опухоли достигали предварительно определенного размера мышам перорально вводили соединение 44 в разных дозах, по различным схемам, в течение периода до 28 дней и/или СНОР/СОР по следующим схемам: Циклофосфамид вводили интраперитонеально (i.p.), а доксорубицин и винкристин каждый вводили посредством болюсных инъекций в хвостовую вену (i.v.); каждое средство давали один раз в сутки на 1 или 8 день в исследовании с SU-DHL6, и на 1 и 22 день в исследованиях с WSU-DLCL2 и SU-DHL10. Преднизон вводили р.о. двумя циклами по 5 доз в сутки, начиная с 1 и 8 дня ((qd x 5) x 2, 1, 8 день) в исследовании с SU-DHL6, и на 1 и 22 день ((qd x 5) x 2, 1, 22 день) в исследованиях с WSU-DLCL2 и SU-DHL10. Каждая доза была доставлена в объеме 0,2 мл/20 г мышь (10 мл/кг), и доведена с поправкой на последний зарегистрированный вес для отдельных животных. Показатели веса опухоли и тела получали дважды в неделю в течение 28 дней для всех исследований. Для определения задержки роста опухоли в исследованиях с SU-DHL10 и SU-DHL6 каждое исследуемое животное умерщвляли по достижении конечной точки объема новообразования, составляющей 2000 мм<sup>3</sup>, или на последний день исследования (60 день), в зависимости от того, что наступало первым.

#### *Количественная PCR*

Клетки WSU-DLCL2, SU-DHL10, RL, SU-DHL4, OCI-LY19 и DOKH2 обрабатывали в параллели с DMSO, 1 мкМ соединения 44 (SU-DHL10 обрабатывали 100 нМ соединения 44), дозой преднизолона в концентрации, в 10 раз меньшей значения IC<sub>50</sub> на 4 день, или комбинацией лекарственных средств в течение 4 дней. Клетки собирали и из осадков клеток выделяли общую mRNA с применением RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen; 74134). Для анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR (Qiagen; PAHS-154ZE-4), cDNA получали с применением набора RT2 First Strand Kit (Qiagen; 330401). RT-PCR-анализ осуществляли с применением ViiA 7 Real-Time PCR Systems [Applied Biosystems (AB)] с RT2 SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen; 330521). Уровень генной экспрессии нормализовали относительно уровня B2M в анализе экспрессии, и кратность изменения



относительно DMSO рассчитывали с применением способа  $\Delta\Delta C_t$ . С целью подтверждения данных анализа экспрессии, проводили qPCR на основе зонда TaqMan с применением TaqMan Fast Advanced Master Mix (AB; 4444964) и наборов праймер/зонд от TaqMan для Sestrin (AB; Hs00902787\_m1) и TNF (AB; Hs01113624\_m1). Кратность изменения рассчитывали как описано выше, с нормализацией относительно RPLPO (AB; 4333761F).

### *ELISA*

Гистоны выделяли из образцов опухоли как описано выше. Гистоны получали в эквивалентных концентрациях в буфере для иммобилизации (PBS + 0,05%BSA) с получением 0,5 нг/мкл на образец, и 100 мкл образца или эталона добавляли в двух повторностях в 2 96-луночных планшета для ELISA (Thermo LabSystems, Immulon 4NBX #3885). Планшеты накрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты отмывали 3x 300 мкл/лунку PBST (PBS + 0,05% Tween 20; 10X PBST, KPL #51-14-02) в машине для мойки планшетов Bio Tek. Блокировку планшетов проводили разбавителем в объеме 300 мкл/лунку (PBS + 2%BSA + 0,05% Tween 20), инкубировали при RT в течение 2 часов и отмывали 3x PBST. Все антитела разбавляли в разбавителе. В каждый планшет добавляли антитела к H3K27me3 в объеме 100 мкл/лунку (CST #9733, исходный раствор в 50% глицерине 1:1000) или антитела к общему H3 (Abcam ab1791, 50% глицерин 1:10000). Планшеты инкубировали в течение 90 мин. при RT и отмывали 3x PBST. 100 мкл/лунку антител к Rb-IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 7074) добавляли в разведении 1:2000 в планшет H3K27Me3, в разведении 1:6000 в планшет H3 и инкубировали в течение 90 мин. при RT. Планшеты отмывали 4X PBST. С целью детектирования добавляли субстрат TMB в объеме 100 мкл/лунку (BioFx Laboratories, #TMBS) и планшеты инкубировали в темноте при RT в течение 5 мин. Реакцию останавливали 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в объеме 100 мкл/лунку. Поглощение при 450 нМ считывали с применением считывающего устройства для микропланшетов SpectraMax M5.

Таблица 4а. Значения Ct и кратность изменений на основе анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR для клеточной линии ОС1.

Gene	Ct Values				ΔCt (β2M)				Cpd44		Pred		C combo	
	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	ΔΔCt	Fold Change	ΔΔCt	Fold Change	ΔΔCt	Fold Change
ADARB1	24.373	23.799	24.946	24.323	7.368	6.580	7.319	7.177	-0.788	1.727	-0.049	1.035	-0.191	1.142
AFF1	21.574	21.780	21.892	21.613	4.569	4.561	4.265	4.467	-0.008	1.006	-0.304	1.235	-0.102	1.073
AK2	20.300	20.497	20.859	20.656	3.295	3.278	3.232	3.510	-0.017	1.012	-0.063	1.045	0.215	0.862
AMPD3	27.424	26.984	27.937	27.892	10.419	9.765	10.310	10.746	-0.654	1.574	-0.109	1.078	0.327	0.797
ANGPTL4	30.465	30.374	30.333	29.769	13.460	13.155	12.706	12.623	-0.305	1.235	-0.754	1.686	-0.837	1.786
ANXA4	23.319	23.379	24.130	23.394	6.314	6.160	6.503	6.248	-0.154	1.113	0.189	0.877	-0.066	1.047
AQP1	Undetermined	31.992	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	14.773	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ARID5B	22.092	22.537	22.635	22.538	5.087	5.318	5.008	5.392	0.231	0.852	-0.079	1.056	0.305	0.809
ASPH	27.926	27.556	28.894	27.701	10.921	10.337	11.267	10.555	-0.584	1.499	0.346	0.787	-0.366	1.289
ATF4	18.500	18.838	19.578	19.368	1.495	1.619	1.951	2.222	0.124	0.918	0.456	0.729	0.727	0.604
BCL6	27.421	26.240	28.282	26.459	10.416	9.021	10.655	9.313	-1.395	2.630	0.239	0.847	-1.103	2.148
BMPER	Undetermined	34.674	Undetermined	32.290	#VALUE!	17.455	#VALUE!	15.144	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CALCR	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPA	30.199	27.522	30.852	28.731	13.194	10.303	13.225	11.585	-2.891	7.418	0.031	0.979	-1.609	3.050
CEBPB	23.119	23.723	24.427	24.678	6.114	6.504	6.800	7.532	0.390	0.763	0.686	0.622	1.418	0.374
COL4A2	32.777	33.300	35.000	32.293	15.772	16.081	17.373	15.147	0.309	0.807	1.601	0.330	-0.625	1.542
CREB1	22.477	22.697	23.159	22.702	5.472	5.478	5.532	5.556	0.006	0.996	0.060	0.959	0.084	0.943
CREB3	24.708	24.979	25.174	24.863	7.703	7.760	7.547	7.717	0.057	0.961	-0.156	1.114	0.014	0.990
CREB3L4	24.162	24.000	24.936	24.497	7.157	6.781	7.309	7.351	-0.376	1.298	0.152	0.900	0.194	0.874
CTGF	21.557	21.719	21.099	20.311	4.552	4.500	3.472	3.165	-0.052	1.037	-1.080	2.114	-1.387	2.615
CYB561	Undetermined	33.134	Undetermined	32.534	#VALUE!	15.915	#VALUE!	15.388	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DDIT4	24.102	23.567	23.551	23.195	7.097	6.348	5.924	6.049	-0.749	1.681	-1.173	2.255	-1.048	2.068
DIRAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DUSP1	20.981	20.800	21.767	21.200	3.976	3.581	4.140	4.054	-0.395	1.315	0.164	0.893	0.078	0.947
EDN1	Undetermined	Undetermined	33.433	32.487	#VALUE!	#VALUE!	15.806	15.341	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
EHF3	28.984	28.117	28.833	27.236	11.979	10.898	11.206	10.090	-1.081	2.116	-0.773	1.709	-1.889	3.704
ERRFI1	Undetermined	Undetermined	32.824	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	15.197	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
FKBP5	22.604	22.499	22.353	21.699	5.599	5.280	4.726	4.553	-0.319	1.247	-0.873	1.831	-1.046	2.065
FOSL2	26.226	26.214	26.368	25.547	9.221	8.995	8.741	8.401	-0.226	1.170	-0.480	1.395	-0.820	1.765
GOPD1	26.444	26.638	27.196	26.808	9.439	9.419	9.569	9.662	-0.020	1.014	0.130	0.914	0.223	0.857
GHRHR	37.467	33.641	35.486	36.113	20.462	16.422	17.859	18.967	-4.040	16.450	-2.603	6.075	-1.495	2.819
GLUL	22.916	22.385	23.448	22.402	5.911	5.166	5.821	5.256	-0.745	1.676	-0.090	1.064	-0.655	1.575
GOT1	23.094	23.224	23.810	23.450	6.089	6.005	6.183	6.304	-0.084	1.060	0.094	0.937	0.215	0.862
H6PD	26.842	26.141	26.981	26.440	9.837	8.922	9.354	9.294	-0.915	1.886	-0.483	1.398	-0.543	1.457
HAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
HNRP1L	29.840	29.708	30.306	29.439	12.835	12.489	12.679	12.293	-0.346	1.271	-0.156	1.114	-0.542	1.456
IL10	Undetermined	Undetermined	34.155	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	16.528	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL1RN	33.932	32.902	Undetermined	Undetermined	16.927	15.683	#VALUE!	#VALUE!	-1.244	2.369	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6	Undetermined	Undetermined	Undetermined	32.602	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	15.456	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6R	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
KLF13	23.416	23.178	23.963	23.145	6.411	5.999	6.336	5.999	-0.452	1.368	-0.075	1.053	-0.412	1.331
KLF9	29.546	28.545	28.597	27.791	12.541	11.326	10.970	10.645	-1.215	2.321	-1.571	2.971	-1.896	3.722
LOX	33.344	32.825	32.787	31.904	16.339	15.606	15.160	14.758	-0.733	1.662	-1.179	2.264	-1.581	2.992
MERTK	29.340	28.749	29.685	28.885	12.335	11.530	12.058	11.739	-0.805	1.747	-0.277	1.212	-0.596	1.512
MT1E	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT2A	22.845	22.941	23.298	22.515	5.840	5.722	5.671	5.369	-0.118	1.085	-0.169	1.124	-0.471	1.386

NFKBIA	21.672	21.905	22.337	21.755	4.667	4.686	4.710	4.609	0.019	0.987	0.043	0.971	-0.058	1.041
NR3C1	20.940	21.131	21.276	20.605	3.935	3.912	3.649	3.459	-0.023	1.016	-0.286	1.219	-0.476	1.391
PDCD7	23.121	23.359	28.314	23.491	6.116	6.140	10.687	6.345	0.024	0.984	4.571	0.042	0.229	0.853
PDGFRB	32.160	33.308	30.540	30.932	15.155	16.089	12.913	13.786	0.934	0.523	-2.242	4.731	-1.369	2.583
PDP1	26.092	25.788	26.292	25.520	9.087	8.569	8.665	8.374	-0.518	1.432	-0.422	1.340	-0.713	1.639
PER1	24.615	25.503	25.500	26.016	7.610	8.284	7.873	8.870	0.674	0.627	0.263	0.833	1.260	0.418
PER2	Undetermined	23.177	23.707	23.482	#VALUE!	5.958	6.080	6.336	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PIK3R1	23.175	23.115	23.678	23.317	6.170	5.896	6.051	6.171	-0.274	1.209	-0.119	1.086	0.001	0.999
PLD1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	33.540	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	16.394	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PLEKHF1	30.216	29.694	30.977	30.285	13.211	12.475	13.350	13.139	-0.736	1.666	0.139	0.908	-0.072	1.051
POU2F1	24.562	24.656	25.232	24.555	7.557	7.437	7.605	7.409	-0.120	1.087	0.048	0.967	-0.148	1.108
POU2F2	31.495	31.740	31.543	31.643	14.490	14.521	13.916	14.497	0.031	0.979	-0.574	1.489	0.007	0.995
RASA3	23.112	23.251	23.743	23.462	6.107	6.032	6.116	6.316	-0.075	1.053	0.009	0.994	0.209	0.865
RGS2	28.455	27.701	29.467	28.122	11.450	10.482	11.840	10.976	-0.968	1.956	0.390	0.763	-0.474	1.389
RHOB	22.108	20.944	20.967	19.659	5.103	3.725	3.340	2.513	-1.378	2.599	-1.763	3.394	-2.590	6.021
RHOJ	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
SESN1	22.463	22.424	23.126	22.491	5.458	5.205	5.499	5.345	-0.253	1.192	0.041	0.972	-0.113	1.081
SGK1	26.351	26.107	25.819	24.816	9.346	8.888	8.192	7.670	-0.458	1.374	-1.154	2.225	-1.676	3.195
SIC10A6	31.403	30.432	31.656	32.746	14.398	13.213	14.029	15.600	-1.185	2.274	-0.369	1.291	1.202	0.435
SIC19A2	24.878	24.881	25.910	25.274	7.873	7.662	8.283	8.128	-0.211	1.157	0.410	0.753	0.255	0.838
SIC22A5	29.254	29.101	30.112	29.115	12.249	11.882	12.485	11.969	-0.367	1.290	0.236	0.849	-0.280	1.214
SNTA1	28.151	27.457	28.892	28.483	11.146	10.238	11.265	11.337	-0.908	1.876	0.119	0.921	0.191	0.876
SPHK1	28.555	28.787	29.199	29.124	11.550	11.568	11.572	11.978	0.018	0.988	0.022	0.985	0.428	0.743
SPSB1	27.338	27.455	28.347	28.097	10.333	10.236	10.720	10.951	-0.097	1.070	0.387	0.765	0.618	0.652
STAT5A	22.115	22.442	22.673	22.391	5.110	5.223	5.046	5.245	0.113	0.925	-0.064	1.045	0.135	0.911
STAT5B	22.886	22.979	23.838	23.297	5.881	5.760	6.211	6.151	-0.121	1.087	0.330	0.796	0.270	0.829
TBL1XR1	21.317	21.488	21.705	21.430	4.312	4.269	4.078	4.284	-0.043	1.030	-0.234	1.176	-0.028	1.020
TNF	24.763	24.377	24.612	23.620	7.758	7.158	6.985	6.474	-0.600	1.516	-0.773	1.709	-1.284	2.435
TNFAIP3	22.296	22.827	23.168	23.327	5.291	5.608	5.541	6.181	0.317	0.803	0.250	0.841	0.890	0.540
TSC22D3	25.692	25.235	24.619	24.219	8.687	8.016	6.992	7.073	-0.671	1.592	-1.695	3.238	-1.614	3.061
USP2	33.949	31.341	33.986	32.493	16.944	14.122	16.359	15.347	-2.822	7.071	-0.585	1.500	-1.597	3.025
USP54	24.856	25.235	25.764	24.989	7.851	8.016	8.137	7.843	0.165	0.892	0.286	0.820	-0.008	1.006
VDR	25.093	24.754	24.985	24.651	8.088	7.535	7.358	7.505	-0.553	1.467	-0.730	1.659	-0.583	1.498
VLDLR	28.968	28.902	29.671	29.488	11.963	11.683	12.044	12.342	-0.280	1.214	0.081	0.945	0.379	0.769
XDH	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ZFP36	24.550	25.191	Undetermined	25.349	7.545	7.972	#VALUE!	8.203	0.427	0.744	#VALUE!	#VALUE!	0.658	0.634
ZHX3	24.941	24.761	24.833	24.322	7.936	7.542	7.206	7.176	-0.394	1.314	-0.730	1.659	-0.760	1.693
ZNF281	22.504	23.249	23.997	23.695	5.499	6.030	6.370	6.549	0.531	0.692	0.871	0.547	1.050	0.483
ACTB	15.098	14.892	16.093	14.987	-1.907	-2.327	-1.534	-2.159						
B2M	17.005	17.219	17.627	17.146	0.000	0.000	0.000	0.000						
GAPDH	15.880	16.149	16.519	16.647	-1.125	-1.070	-1.108	-0.499						
HPRT1	21.462	21.828	22.125	21.813	4.457	4.609	4.498	4.667						
RPLP0	14.351	14.350	15.011	14.197	-2.654	-2.869	-2.616	-2.949						
HGDC	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!						
RTC	22.174	21.961	21.962	22.251	5.169	4.742	4.335	5.105						
RTC	22.089	21.953	22.140	22.008	5.084	4.734	4.513	4.862						
RTC	22.195	21.961	22.167	21.993	5.190	4.742	4.540	4.847						
PPC	18.397	18.268	18.432	18.371	1.392	1.049	0.805	1.225						
PPC	18.426	18.330	18.320	18.347	1.421	1.111	0.693	1.201						
PPC	18.301	17.672	18.372	18.378	1.296	0.453	0.745	1.232						

**Условные обозначения:**

**Gene** – ген

**Ct values** – значения Ct

**Pred** - Преднизолон

**#VALUE!** - #ЗНАЧЕНИЕ!

**Combo** - Комбинация

**Fold change** – кратность изменения

**Undetermined** – не определено

Таблица 4b. Значения Ct и кратность изменений на основе анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR для клеточной линии DHH2.

Gene	Ct Values				ACT (B2M)				Cpd44		Pred		Combo	
	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	AACT	Fold Change	AACT	Fold Change	AACT	Fold Change
ADARB1	31.818	31.431	33.560	30.189	12.809	12.855	14.676	12.038	0.046	0.969	1.867	0.274	-0.771	1.706
AFF1	24.684	23.888	23.992	23.224	5.675	5.312	5.108	5.073	-0.363	1.286	-0.567	1.481	-0.602	1.518
AK2	20.334	20.173	20.262	19.961	1.325	1.597	1.378	1.810	0.272	0.828	0.053	0.964	0.485	0.714
AMPD3	26.401	26.146	27.535	26.852	7.392	7.570	8.651	8.701	0.178	0.884	1.259	0.418	1.309	0.404
ANGPTL4	31.134	30.820	31.538	30.854	12.125	12.244	12.654	12.703	0.119	0.921	0.529	0.693	0.578	0.670
ANXA4	24.817	24.273	24.997	24.268	5.808	5.697	6.113	6.117	-0.111	1.080	0.305	0.809	0.309	0.807
AQP1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ARID5B	23.881	23.782	23.885	23.886	4.872	5.206	5.001	5.735	0.334	0.793	0.129	0.914	0.863	0.550
ASPM	22.970	22.823	23.369	22.996	3.961	4.247	4.485	4.845	0.286	0.820	0.524	0.695	0.884	0.542
ATF4	19.156	19.190	19.313	18.983	0.147	0.614	0.429	0.832	0.467	0.723	0.282	0.822	0.685	0.622
BCL6	21.529	21.323	21.801	21.773	2.520	2.747	2.917	3.622	0.227	0.854	0.397	0.759	1.102	0.466
BMPER	38.037	39.092	39.378	39.656	19.028	20.516	20.494	21.505	1.488	0.357	1.466	0.362	2.477	0.180
CALCR	Undetermined	33.630	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	15.054	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPA	34.654	30.676	32.188	30.646	15.645	12.100	13.304	12.495	-3.545	11.672	-2.341	5.067	-3.150	8.877
CEBPB	23.911	23.925	24.317	24.001	4.902	5.349	5.433	5.850	0.447	0.734	0.531	0.692	0.948	0.518
COL4A2	32.314	34.119	38.993	34.143	13.305	15.543	20.109	15.992	2.238	0.212	6.804	0.009	2.687	0.155
CREB1	22.930	22.746	22.890	22.730	3.921	4.170	4.006	4.579	0.249	0.841	0.085	0.943	0.658	0.634
CREB3	24.929	24.840	24.865	24.647	5.920	6.264	5.981	6.496	0.344	0.788	0.061	0.959	0.576	0.671
CREB3L4	24.405	24.110	24.616	24.373	5.396	5.534	5.732	6.222	0.138	0.909	0.336	0.792	0.826	0.564
CTGF	33.711	32.760	33.728	33.696	14.702	14.184	14.844	15.545	-0.518	1.432	0.142	0.906	0.843	0.557
CYB561	37.790	31.945	39.582	34.331	18.781	13.369	20.698	16.180	-5.412	42.577	1.917	0.265	-2.601	6.067
DDIT4	23.934	23.508	24.105	22.948	4.925	4.932	5.221	4.797	0.007	0.995	0.296	0.815	-0.128	1.093
DIRAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DUSP1	27.604	27.132	27.866	27.262	8.595	8.556	8.982	9.111	-0.039	1.027	0.387	0.765	0.516	0.699
EDN1	31.233	32.260	32.263	31.224	12.224	13.684	13.379	13.073	1.460	0.363	1.155	0.449	0.849	0.555
EHD3	32.315	28.852	31.098	28.674	13.306	10.276	12.214	10.523	-3.030	8.168	-1.092	2.132	-2.783	6.883
ERRFI1	32.525	30.163	32.635	29.588	13.516	11.587	13.751	11.437	-1.929	3.808	0.235	0.850	-2.079	4.225
FKBP5	21.985	21.520	20.912	20.512	2.976	2.944	2.028	2.361	-0.032	1.022	-0.948	1.929	-0.615	1.532
FOSL2	31.767	29.872	31.543	29.925	12.758	11.296	12.659	11.774	-1.462	2.755	-0.099	1.071	-0.984	1.978
GDPD1	27.532	27.570	27.884	27.396	8.523	8.994	9.000	9.245	0.471	0.721	0.477	0.718	0.722	0.606
GHRHR	37.684	39.644	36.095	37.813	18.675	21.068	17.211	19.662	2.393	0.190	-1.464	2.759	0.987	0.505
GLUL	36.133	36.671	34.574	36.099	17.124	18.095	15.690	17.948	0.971	0.510	-1.434	2.702	0.824	0.565
GOT1	23.427	23.126	23.532	22.880	4.418	4.550	4.648	4.729	0.132	0.913	0.230	0.853	0.311	0.806

H6PD	24.717	24.377	24.969	24.453	5.708	5.801	6.085	6.302	0.093	0.938	0.377	0.770	0.594	0.663
HAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
HNRPLL	30.324	29.151	33.284	31.380	11.315	10.575	14.400	13.229	-0.740	1.670	3.085	0.118	1.914	0.265
IL10	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL1RN	Undetermined	32.271	33.560	31.586	#VALUE!	13.695	14.676	13.435	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6	Undetermined	Undetermined	34.758	37.608	#VALUE!	#VALUE!	15.874	19.457	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6R	Undetermined	31.962	Undetermined	32.383	#VALUE!	13.386	#VALUE!	14.232	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
KLF13	22.951	22.420	22.546	21.765	3.942	3.844	3.662	3.614	-0.098	1.070	-0.280	1.214	-0.328	1.255
KLF9	28.691	28.439	28.547	27.741	9.682	9.863	9.663	9.590	0.181	0.882	-0.019	1.013	-0.092	1.066
LOX	33.562	32.997	34.158	32.855	14.553	14.421	15.274	14.704	-0.132	1.096	0.721	0.607	0.151	0.901
MERTK	32.997	32.456	32.892	31.474	13.988	13.880	14.008	13.323	-0.108	1.078	0.020	0.986	-0.665	1.586
MT1E	39.692	Undetermined	Undetermined	Undetermined	20.683	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT2A	39.646	Undetermined	Undetermined	Undetermined	20.637	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
NFKBIA	22.891	22.625	22.830	22.625	3.882	4.049	3.946	4.474	0.167	0.891	0.064	0.957	0.592	0.663
NR3C1	22.602	22.430	22.794	22.573	3.593	3.854	3.910	4.422	0.261	0.835	0.317	0.803	0.829	0.563
PDCD7	23.656	23.417	23.552	23.397	4.647	4.841	4.668	5.246	0.194	0.874	0.021	0.986	0.599	0.660
PDGFRB	Undetermined	35.193	34.934	31.552	#VALUE!	16.617	16.050	13.401	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PDP1	25.863	25.175	25.682	25.330	6.854	6.599	6.798	7.179	-0.255	1.193	-0.056	1.040	0.325	0.798
PER1	24.944	24.717	25.142	25.289	5.935	6.141	6.258	7.138	0.206	0.867	0.323	0.799	1.203	0.434
PER2	24.642	23.835	24.159	23.476	5.633	5.259	5.275	5.325	-0.374	1.296	-0.358	1.282	-0.308	1.238
PIK3R1	24.177	23.712	23.850	23.610	5.168	5.136	4.966	5.459	-0.032	1.022	-0.202	1.150	0.291	0.817
PLD1	37.038	Undetermined	37.120	38.323	18.029	#VALUE!	18.236	20.172	#VALUE!	#VALUE!	0.207	0.866	2.143	0.226
PLEKHF1	29.886	28.946	29.414	28.738	10.877	10.370	10.530	10.587	-0.507	1.421	-0.347	1.272	-0.290	1.223
POU2F1	24.378	24.003	24.648	23.667	5.369	5.427	5.764	5.516	0.058	0.961	0.395	0.760	0.147	0.903
POU2F2	22.469	22.167	22.489	21.930	3.460	3.591	3.605	3.779	0.131	0.913	0.145	0.904	0.319	0.802
RASA3	27.152	27.636	27.803	28.392	8.143	9.060	8.919	10.241	0.917	0.530	0.776	0.584	2.098	0.234
RGS2	24.790	24.861	25.514	25.639	5.781	6.285	6.630	7.488	0.504	0.705	0.849	0.555	1.707	0.306
RHOB	32.661	30.745	33.162	30.702	13.652	12.169	14.278	12.551	-1.483	2.795	0.626	0.648	-1.101	2.145
RHOJ	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
SESN1	24.226	23.848	22.839	21.993	5.217	5.272	3.955	3.842	0.055	0.963	-1.262	2.398	-1.375	2.594
SGK1	27.633	27.821	29.628	29.125	8.624	9.245	10.744	10.974	0.621	0.650	2.120	0.230	2.350	0.196
SLC10A6	34.483	36.435	36.176	32.738	15.474	17.859	17.292	14.587	2.385	0.191	1.818	0.284	-0.887	1.849
SLC19A2	25.600	24.859	25.455	24.769	6.591	6.283	6.571	6.618	-0.308	1.238	-0.020	1.014	0.027	0.981
SLC22A5	28.392	27.992	28.915	27.835	9.383	9.416	10.031	9.684	0.033	0.977	0.648	0.638	0.301	0.812
SNTA1	24.584	24.550	25.124	25.000	5.575	5.974	6.240	6.849	0.399	0.758	0.665	0.631	1.274	0.414
SPHK1	30.677	28.863	29.971	28.646	11.668	10.287	11.087	10.495	-1.381	2.604	-0.581	1.496	-1.173	2.255
SPSB1	27.110	26.652	26.911	26.621	8.101	8.076	8.027	8.470	-0.025	1.017	-0.074	1.053	0.369	0.774

STAT5A	24.237	23.771	23.885	23.477	5.228	5.195	5.001	5.326	-0.033	1.023	-0.227	1.170	0.098	0.934
STAT5B	22.503	22.328	22.632	22.414	3.494	3.752	3.748	4.263	0.258	0.836	0.254	0.839	0.769	0.587
TBL1XR1	21.397	20.994	21.304	21.133	2.388	2.418	2.420	2.982	0.030	0.979	0.032	0.978	0.594	0.663
TNF	31.328	31.849	31.956	31.194	12.319	13.273	13.072	13.043	0.954	0.516	0.753	0.593	0.724	0.605
TNFAIP3	28.260	27.520	Undetermined	30.586	9.251	8.944	#VALUE!	12.435	-0.307	1.237	#VALUE!	#VALUE!	3.184	0.110
TSC22D3	25.176	24.752	23.310	22.374	6.167	6.176	4.426	4.223	0.009	0.994	-1.741	3.343	-1.944	3.848
USP2	24.104	23.684	23.501	22.971	5.095	5.108	4.617	4.820	0.013	0.991	-0.478	1.393	-0.275	1.210
USP54	26.599	25.892	26.683	25.856	7.590	7.316	7.799	7.705	-0.274	1.209	0.209	0.865	0.115	0.923
VDR	27.406	26.426	26.847	26.577	8.397	7.850	7.963	8.426	-0.547	1.461	-0.434	1.351	0.029	0.980
VLDLR	27.166	27.232	28.584	27.543	8.157	8.656	9.700	9.392	0.499	0.708	1.543	0.343	1.235	0.425
XDH	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ZFP36	24.170	23.980	24.270	24.094	5.161	5.404	5.386	5.943	0.243	0.845	0.225	0.856	0.782	0.582
ZHX3	25.200	24.611	24.418	23.897	6.191	6.035	5.534	5.746	-0.156	1.114	-0.657	1.577	-0.445	1.361
ZNF281	24.066	23.541	23.828	23.343	5.057	4.965	4.944	5.192	-0.092	1.066	-0.113	1.081	0.135	0.911
ACTB	14.843	14.519	14.721	14.509	-4.166	-4.057	-4.163	-3.642						
B2M	19.009	18.576	18.884	18.151	0.000	0.000	0.000	0.000						
GAPDH	16.513	16.197	16.551	16.157	-2.496	-2.379	-2.333	-1.994						
HPRT1	21.698	21.561	21.777	21.657	2.689	2.985	2.893	3.506						
RPLP0	15.187	14.935	15.128	14.595	-3.822	-3.641	-3.756	-3.556						
HGDC	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!						
RTC	21.284	21.345	21.449	21.483	2.275	2.769	2.565	3.332						
RTC	21.287	21.410	21.464	21.371	2.278	2.834	2.580	3.220						
RTC	21.358	21.384	21.483	21.483	2.349	2.808	2.599	3.332						
PPC	18.611	18.672	18.684	18.624	-0.398	0.096	-0.200	0.473						
PPC	18.638	19.142	18.699	18.587	-0.371	0.566	-0.185	0.436						
PPC	18.646	18.711	19.076	18.685	-0.363	0.135	0.192	0.534						

**Условные обозначения:**

**Gene** – ген

**Ct values** – значения Ct

**Pred** - Преднизолон

**#VALUE!** - #ЗНАЧЕНИЕ!

**Combo** - Комбинация

**Fold change** – кратность изменения

**Undetermined** – не определено

Таблица 4с. Значения Ct и кратность изменений на основе анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR для клеточной линии WSU.

Gene	Ct Values				ΔCT (B2M)				Cpd44		Pred		Combo	
	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	AACT	Fold Change	AACT	Fold Change	AACT	Fold Change
ADARB1	26.316	25.386	26.108	26.018	6.866	5.701	6.963	5.845	-1.165	2.242	0.097	0.935	-1.021	2.029
AFF1	28.103	27.925	27.334	26.727	8.653	8.240	8.189	6.554	-0.413	1.331	-0.464	1.379	-2.099	4.284
AK2	20.644	21.365	20.433	22.069	1.194	1.680	1.288	1.896	0.486	0.714	0.094	0.937	0.702	0.615
AMPD3	28.467	27.162	27.943	26.847	9.017	7.477	8.798	6.674	-1.540	2.908	-0.219	1.164	-2.343	5.074
ANGPTL4	31.444	30.487	30.810	31.510	11.994	10.802	11.665	11.337	-1.192	2.285	-0.329	1.256	-0.657	1.577
ANXA4	27.736	24.659	27.406	25.013	8.286	4.974	8.261	4.840	-3.312	9.931	-0.025	1.017	-3.446	10.898
AQP1	Undetermined	33.645	33.595	32.796	#VALUE!	13.960	14.450	12.623	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ARID5B	26.244	26.126	26.721	27.140	6.794	6.441	7.576	6.967	-0.353	1.277	0.782	0.582	0.173	0.887
ASPH	22.285	22.415	21.939	22.834	2.835	2.730	2.794	2.661	-0.105	1.075	-0.041	1.029	-0.174	1.128
ATF4	19.874	20.470	19.659	20.871	0.424	0.785	0.514	0.698	0.361	0.779	0.090	0.940	0.274	0.827
BCL6	20.954	20.795	20.898	21.133	1.504	1.110	1.753	0.960	-0.394	1.314	0.249	0.841	-0.544	1.458
BMPER	39.814	Undetermined	Undetermined	38.494	20.364	#VALUE!	#VALUE!	18.321	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	-2.043	4.121
CALCR	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPA	28.438	27.014	27.838	27.647	8.988	7.329	8.693	7.474	-1.659	3.158	-0.295	1.227	-1.514	2.856
CEBPB	25.266	26.770	25.775	27.187	5.816	7.085	6.630	7.014	1.269	0.415	0.814	0.569	1.198	0.436
COL4A2	Undetermined	Undetermined	34.328	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	15.183	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CREB1	23.170	23.413	22.732	23.778	3.720	3.728	3.587	3.605	0.008	0.994	-0.133	1.097	-0.115	1.083
CREB3	25.309	25.459	24.551	25.393	5.859	5.774	5.406	5.220	-0.085	1.061	-0.453	1.369	-0.639	1.557
CREB3L4	25.072	24.392	24.437	24.344	5.622	4.707	5.292	4.171	-0.915	1.886	-0.330	1.257	-1.451	2.734
CTGF	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CYB56L	36.874	31.478	32.971	33.799	17.424	11.793	13.826	13.626	-5.631	49.556	-3.598	12.109	-3.798	13.910
DDIT4	24.229	24.404	22.252	22.739	4.779	4.719	3.107	2.566	-0.060	1.042	-1.672	3.187	-2.213	4.636
DIRAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DUSP1	25.679	27.284	25.828	26.552	6.229	7.599	6.683	6.379	1.370	0.387	0.454	0.730	0.150	0.901
EDN1	Undetermined	26.349	30.819	26.407	#VALUE!	6.664	11.674	6.234	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
EHD3	29.674	24.270	27.724	24.166	10.224	4.585	8.579	3.993	-5.639	49.832	-1.645	3.127	-6.231	75.113
ERRFI1	Undetermined	32.771	Undetermined	32.896	#VALUE!	13.086	#VALUE!	12.723	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
FKBP5	22.873	23.267	21.321	21.824	3.423	3.582	2.176	1.651	0.159	0.896	-1.247	2.373	-1.772	3.415
FOSL2	31.109	34.140	33.647	34.690	11.559	14.455	14.502	14.517	2.796	0.144	2.843	0.139	2.858	0.138
GDPD1	28.371	27.494	28.235	27.303	8.921	7.809	9.090	7.130	-1.112	2.161	0.169	0.889	-1.791	3.461
GHRHR	34.636	39.957	37.789	Undetermined	15.186	20.272	18.644	#VALUE!	5.086	0.029	3.458	0.091	#VALUE!	#VALUE!
GLUL	Undetermined	28.395	31.475	30.591	#VALUE!	8.710	12.330	10.418	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
GOT1	22.884	23.827	22.841	24.411	3.434	4.142	3.696	4.238	0.708	0.612	0.262	0.834	0.804	0.573



H6PD	26.360	25.976	26.197	25.435	6.910	6.291	7.052	5.262	-0.619	1.536	0.142	0.906	-1.648	3.134
HAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
HNRPLL	23.972	24.170	24.750	26.864	4.522	4.485	5.605	6.691	-0.037	1.026	1.083	0.472	2.169	0.222
IL10	Undetermined	34.229	34.306	35.010	#VALUE!	14.544	15.161	14.837	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL1RM	32.606	28.388	33.599	29.393	13.156	8.703	14.454	9.220	-4.453	21.902	1.298	0.407	-3.936	15.306
IL6	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6R	Undetermined	33.814	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	14.129	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
KLF13	24.539	23.800	23.792	23.671	5.089	4.115	4.647	3.498	-0.974	1.964	-0.442	1.358	-1.591	3.013
KLF9	30.841	28.881	30.105	28.187	11.391	9.196	10.960	8.014	-2.195	4.579	-0.431	1.348	-3.377	10.389
LOX	34.266	34.399	34.511	34.207	14.816	14.714	15.366	14.034	-0.102	1.073	0.550	0.683	-0.782	1.720
MERTK	Undetermined	31.323	32.524	Undetermined	#VALUE!	11.638	13.379	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT1E	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT2A	24.717	23.499	24.518	24.350	5.267	3.814	5.373	4.177	-1.453	2.738	0.106	0.929	-1.090	2.129
NFKBIA	22.371	23.807	22.895	23.454	2.921	4.122	3.750	3.281	1.201	0.435	0.829	0.563	0.360	0.779
NR3C1	23.250	23.121	23.110	23.300	3.800	3.436	3.965	3.127	-0.364	1.287	0.165	0.892	-0.673	1.594
PDCD7	24.179	24.740	23.874	25.248	4.729	5.055	4.729	5.075	0.326	0.798	0.000	1.000	0.346	0.787
PDGFRB	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PDP1	25.371	25.226	24.957	25.536	5.921	5.541	5.812	5.363	-0.380	1.301	-0.109	1.078	-0.558	1.472
PER1	25.109	25.820	24.989	26.651	5.659	6.135	5.844	6.478	0.476	0.719	0.185	0.880	0.819	0.567
PER2	24.451	24.837	24.218	25.563	5.001	5.152	5.073	5.390	0.151	0.901	0.072	0.951	0.389	0.764
PIK3R1	23.734	24.332	23.429	24.080	4.284	4.647	4.284	3.907	0.363	0.778	0.000	1.000	-0.377	1.299
PLD1	Undetermined	Undetermined	35.266	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	16.121	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PLEKHF1	27.205	28.660	26.977	29.585	7.755	8.975	7.832	9.412	1.220	0.429	0.077	0.948	1.657	0.317
POU2F1	24.234	24.671	24.368	24.732	4.784	4.986	5.223	4.559	0.202	0.869	0.439	0.738	-0.225	1.169
POU2F2	23.123	22.678	22.565	22.920	3.673	2.993	3.420	2.747	-0.680	1.602	-0.253	1.192	-0.926	1.900
RASA3	23.952	23.208	23.454	23.293	4.502	3.523	4.309	3.120	-0.979	1.971	-0.193	1.143	-1.382	2.606
RG52	22.902	24.869	23.962	27.302	3.452	5.184	4.817	7.129	1.732	0.301	1.365	0.388	3.677	0.078
RHOB	29.724	27.234	28.803	27.392	10.274	7.549	9.658	7.219	-2.725	6.612	-0.616	1.533	-3.055	8.311
RHOJ	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
SESN1	28.689	25.215	25.915	21.378	9.239	5.530	6.770	1.205	-3.709	13.077	-2.469	5.537	-8.034	262.105
SGK1	25.579	28.624	27.309	30.174	6.129	8.939	8.164	10.001	2.810	0.143	2.035	0.244	3.872	0.068
SLC10A6	36.617	35.684	37.200	39.653	17.167	15.999	18.055	19.480	-1.168	2.247	0.888	0.540	2.313	0.201
SLC19A2	26.638	26.125	25.887	26.101	7.188	6.440	6.742	5.928	-0.748	1.679	-0.446	1.362	-1.260	2.395
SLC22A5	28.901	26.640	29.427	27.488	9.451	6.955	10.282	7.315	-2.496	5.641	0.831	0.562	-2.136	4.395
SNTA1	24.438	24.181	24.329	25.166	4.988	4.496	5.184	4.993	-0.492	1.406	0.196	0.873	0.005	0.997
SPHK1	29.643	29.333	29.804	29.702	10.193	9.648	10.659	9.529	-0.545	1.459	0.466	0.724	-0.664	1.584
SPSB1	29.613	26.952	29.963	27.294	10.163	7.267	10.818	7.121	-2.896	7.444	0.655	0.635	-3.042	8.236

STAT5A	25.567	25.495	25.699	24.956	6.117	5.810	6.554	4.783	-0.307	1.237	0.437	0.739	-1.334	2.521
STAT5B	23.414	23.453	23.270	23.985	3.964	3.768	4.125	3.812	-0.196	1.146	0.161	0.894	-0.152	1.111
TBL1XR1	21.602	22.111	21.479	22.588	2.152	2.426	2.334	2.415	0.274	0.827	0.182	0.881	0.263	0.833
TNF	23.694	25.079	24.151	25.675	4.244	5.394	5.006	5.502	1.150	0.451	0.762	0.590	1.258	0.418
TNFAIP3	24.946	26.903	26.733	28.675	5.496	7.218	7.588	8.502	1.722	0.303	2.092	0.235	3.006	0.124
TSC22D3	25.514	25.390	22.481	21.679	6.064	5.705	3.336	1.506	-0.359	1.283	-2.728	6.625	-4.558	23.556
USP2	22.646	21.903	20.884	20.640	3.196	2.218	1.739	0.467	-0.978	1.970	-1.457	2.745	-2.729	6.630
USP54	26.549	26.807	26.453	27.306	7.099	7.122	7.308	7.133	0.023	0.984	0.209	0.865	0.034	0.977
VDR	30.102	27.293	29.232	27.319	10.652	7.608	10.087	7.146	-3.044	8.248	-0.565	1.479	-3.506	11.361
VLDLR	28.252	32.346	30.596	Undetermined	8.802	12.661	11.451	#VALUE!	3.859	0.069	2.649	0.159	#VALUE!	#VALUE!
XDH	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ZFP36	24.367	25.541	25.166	26.450	4.917	5.856	6.021	6.277	0.939	0.522	1.104	0.465	1.360	0.390
ZHX3	25.774	24.831	25.570	25.485	6.324	5.146	6.425	5.312	-1.178	2.263	0.101	0.932	-1.012	2.017
ZNF281	24.007	23.913	23.608	24.577	4.557	4.228	4.463	4.404	-0.329	1.256	-0.094	1.067	-0.153	1.112
ACTB	14.801	15.450	14.572	16.143	-4.649	-4.235	-4.573	-4.030						
B2M	19.450	19.685	19.145	20.173	0.000	0.000	0.000	0.000						
GAPDH	16.528	17.275	16.349	17.416	-2.922	-2.410	-2.796	-2.757						
HPRT1	21.509	22.793	21.361	23.732	2.059	3.108	2.216	3.559						
RPLP0	15.697	15.681	15.330	15.349	-3.753	-4.004	-3.815	-4.824						
HGDC	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!						
RTC	21.199	20.891	21.392	21.368	1.749	1.206	2.247	1.195						
RTC	21.219	20.949	21.293	21.425	1.769	1.264	2.148	1.252						
RTC	21.216	20.945	21.237	21.320	1.766	1.260	2.092	1.147						
PPC	18.984	18.798	18.835	18.992	-0.466	-0.887	-0.310	-1.181						
PPC	18.832	18.877	18.870	18.841	-0.618	-0.808	-0.275	-1.332						
PPC	18.869	19.007	18.873	18.835	-0.581	-0.678	-0.272	-1.338						

**Условные обозначения:**

**Gene** – ген

**Ct values** – значения Ct

**Pred** - Преднизолон

**#VALUE!** - #ЗНАЧЕНИЕ!

**Combo** - Комбинация

**Fold change** – кратность изменения

**Undetermined** – не определено

Таблица 4d. Значения Ct и кратность изменений на основе анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR для клеточной линии SUDHL10.

Gene	Ct Values				ΔCt (B2M)				Cpd44		Pred		Combo	
	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	AACT	Fold Change	AACT	Fold Change	AACT	Fold Change
ADARB1	30.421	31.215	31.883	32.846	11.995	12.068	14.229	14.012	0.073	0.951	2.234	0.213	2.017	0.247
AFF1	28.478	29.849	27.600	27.812	10.052	10.702	9.946	8.978	0.650	0.637	-0.106	1.076	-1.074	2.105
AK2	20.354	20.974	19.237	20.672	1.928	1.827	1.583	1.838	-0.101	1.073	-0.345	1.270	-0.090	1.064
AMPD3	27.489	27.654	26.390	27.563	9.063	8.507	8.736	8.729	-0.556	1.470	-0.327	1.254	-0.334	1.261
ANGPTL4	30.771	32.107	29.894	31.412	12.345	12.960	12.240	12.578	0.615	0.653	-0.105	1.075	0.233	0.851
ANXA4	26.715	24.961	25.942	24.755	8.289	5.814	8.288	5.921	-2.475	5.560	-0.001	1.001	-2.368	5.162
AQP1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ARID5B	26.837	28.208	27.668	27.409	8.411	9.061	10.014	8.575	0.650	0.637	1.603	0.329	0.164	0.893
ASPH	22.820	23.837	22.217	24.322	4.394	4.690	4.563	5.488	0.296	0.815	0.169	0.889	1.094	0.468
ATF4	18.149	20.607	18.947	20.429	-0.277	1.460	1.293	1.595	1.737	0.300	1.570	0.337	1.872	0.273
BCL6	21.278	22.639	21.573	23.181	2.852	3.492	3.919	4.347	0.640	0.642	1.067	0.477	1.495	0.355
BMPER	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CALCR	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPA	29.205	28.900	29.217	28.372	10.779	9.753	11.563	9.538	-1.026	2.036	0.784	0.581	-1.241	2.364
CEBPB	22.884	26.624	24.539	25.652	4.458	7.477	6.885	6.818	3.019	0.123	2.427	0.186	2.360	0.195
COL4A2	Undetermined	Undetermined	35.603	34.161	#VALUE!	#VALUE!	17.949	15.327	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CREB1	23.139	23.809	22.395	23.638	4.713	4.662	4.741	4.804	-0.051	1.036	0.028	0.981	0.091	0.939
CREB3	25.310	26.452	24.440	25.398	6.884	7.305	6.786	6.564	0.421	0.747	-0.098	1.070	-0.320	1.248
CREB3L4	24.612	26.139	24.960	26.248	6.186	6.992	7.306	7.414	0.806	0.572	1.120	0.460	1.228	0.427
CTGF	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CYB5E1	38.682	37.004	38.074	38.165	20.256	17.857	20.420	19.331	-2.399	5.274	0.164	0.893	-0.925	1.899
DDIT4	23.944	26.109	21.960	21.759	5.518	6.962	4.306	2.925	1.444	0.368	-1.212	2.317	-2.593	6.034
DIRAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DUSP1	29.480	31.300	27.989	28.385	11.054	12.153	10.335	9.551	1.099	0.467	-0.719	1.646	-1.503	2.834
EDN1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
EHD3	26.932	26.768	25.888	25.803	8.506	7.621	8.234	6.969	-0.885	1.847	-0.272	1.207	-1.537	2.902
ERRFI1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
FKBP5	22.120	22.883	19.749	20.675	3.694	3.736	2.095	1.841	0.042	0.971	-1.599	3.029	-1.853	3.613
FOSL2	32.273	32.931	29.990	30.849	13.847	13.784	12.336	12.015	-0.063	1.045	-1.511	2.850	-1.832	3.560
GDPD1	31.627	30.943	29.917	30.011	13.201	11.796	12.263	11.177	-1.405	2.648	-0.938	1.916	-2.024	4.067
GHRHR	Undetermined	Undetermined	36.757	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	19.103	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
GLUL	33.940	Undetermined	Undetermined	Undetermined	15.514	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
GOT1	23.510	25.306	23.519	24.803	5.084	6.159	5.865	5.969	1.075	0.475	0.781	0.582	0.885	0.541

H6PD	26.184	28.126	26.256	26.915	7.758	8.979	8.602	8.081	1.221	0.429	0.844	0.557	0.323	0.799
HAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
HNRPLL	22.972	23.764	22.692	24.016	4.546	4.617	5.038	5.182	0.071	0.952	0.492	0.711	0.636	0.643
IL10	Undetermined	32.505	Undetermined	32.875	#VALUE!	13.358	#VALUE!	14.041	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL1RN	Undetermined	32.182	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	13.035	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6R	Undetermined	33.807	33.801	Undetermined	#VALUE!	14.660	16.147	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
KLF13	25.451	24.536	22.488	22.832	7.025	5.389	4.834	3.998	-1.636	3.108	-2.191	4.566	-3.027	8.151
KLF9	32.931	32.525	30.255	29.691	14.505	13.378	12.601	10.857	-1.127	2.184	-1.904	3.742	-3.648	12.536
LOX	33.500	35.385	32.223	32.465	15.074	16.238	14.569	13.631	1.164	0.446	-0.505	1.419	-1.443	2.719
MERTK	Undetermined	34.652	Undetermined	33.161	#VALUE!	15.505	#VALUE!	14.327	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT1E	Undetermined	Undetermined	Undetermined	34.503	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	15.669	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT2A	34.844	37.225	35.909	35.849	16.418	18.078	18.255	17.015	1.660	0.316	1.837	0.280	0.597	0.661
NFKBIA	22.331	23.654	21.628	22.744	3.905	4.507	3.974	3.910	0.602	0.659	0.069	0.953	0.005	0.997
NR3C1	22.516	23.764	22.000	22.835	4.090	4.617	4.346	4.001	0.527	0.694	0.256	0.837	-0.089	1.064
PDCD7	23.600	25.123	23.256	24.731	5.174	5.976	5.602	5.897	0.802	0.574	0.428	0.743	0.723	0.606
PDGFRB	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PDP1	25.438	26.175	25.178	26.259	7.012	7.028	7.524	7.425	0.016	0.989	0.512	0.701	0.413	0.751
PER1	26.209	27.710	24.762	26.686	7.783	8.563	7.108	7.852	0.780	0.582	-0.675	1.597	0.069	0.953
PER2	23.618	24.780	22.642	24.465	5.192	5.633	4.988	5.631	0.441	0.737	-0.204	1.152	0.439	0.738
PIK3R1	23.509	24.661	22.697	23.585	5.083	5.514	5.043	4.751	0.431	0.742	-0.040	1.028	-0.332	1.259
PLD1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PLEKHF1	27.789	28.979	26.691	27.331	9.363	9.832	9.037	8.497	0.469	0.722	-0.326	1.254	-0.866	1.823
POU2F1	25.115	25.842	24.283	24.827	6.689	6.695	6.629	5.993	0.006	0.996	-0.060	1.042	-0.696	1.620
POU2F2	23.953	25.098	22.977	24.098	5.527	5.951	5.323	5.264	0.424	0.745	-0.204	1.152	-0.263	1.200
RASA3	23.171	24.277	22.449	23.649	4.745	5.130	4.795	4.815	0.385	0.766	0.050	0.966	0.070	0.953
RGS2	24.794	25.587	25.390	26.161	6.368	6.440	7.736	7.327	0.072	0.951	1.368	0.387	0.959	0.514
RHOB	28.583	27.829	27.968	26.383	10.157	8.682	10.314	7.549	-1.475	2.780	0.157	0.897	-2.608	6.097
RHOJ	Undetermined	36.530	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	17.383	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
SESN1	28.405	27.480	24.220	22.646	9.979	8.333	6.566	3.812	-1.646	3.130	-3.413	10.652	-6.167	71.854
SGK1	22.694	25.358	22.897	24.642	4.268	6.211	5.243	5.808	1.943	0.260	0.975	0.509	1.540	0.344
SLC10A6	36.987	37.060	34.670	36.258	18.561	17.913	17.016	17.424	-0.648	1.567	-1.545	2.918	-1.137	2.199
SLC19A2	31.019	30.597	31.940	31.354	12.593	11.450	14.286	12.520	-1.143	2.208	1.693	0.309	-0.073	1.052
SLC22A5	31.275	30.263	32.426	29.324	12.849	11.116	14.772	10.490	-1.733	3.324	1.923	0.264	-2.359	5.130
SNTA1	25.751	27.003	24.913	26.374	7.325	7.856	7.259	7.540	0.531	0.692	-0.066	1.047	0.215	0.862
SPHK1	26.852	27.804	25.801	27.082	8.426	8.657	8.147	8.248	0.231	0.852	-0.279	1.213	-0.178	1.131
SPSB1	25.856	26.133	24.455	24.642	7.430	6.986	6.801	5.808	-0.444	1.360	-0.629	1.546	-1.622	3.078

STAT5A	24.170	25.275	23.779	24.550	5.744	6.128	6.125	5.716	0.384	0.766	0.381	0.768	-0.028	1.020
STAT5B	23.533	24.281	23.480	24.231	5.107	5.134	5.826	5.397	0.027	0.981	0.719	0.608	0.290	0.818
TBL1XR1	20.891	21.846	20.224	21.815	2.465	2.699	2.570	2.981	0.234	0.850	0.105	0.930	0.516	0.699
TNF	23.208	23.725	22.657	24.669	4.782	4.578	5.003	5.835	-0.204	1.152	0.221	0.858	1.053	0.482
TNFAIP3	26.832	27.677	27.010	26.749	8.406	8.530	9.356	7.915	0.124	0.918	0.950	0.518	-0.491	1.405
TSC22D3	25.441	28.871	23.160	22.809	7.015	9.724	5.506	3.975	2.709	0.153	-1.509	2.846	-3.040	8.225
USP2	22.643	23.434	21.579	22.360	4.217	4.287	3.925	3.526	0.070	0.953	-0.292	1.224	-0.691	1.614
USP54	27.132	27.789	26.401	27.379	8.706	8.642	8.747	8.545	-0.064	1.045	0.041	0.972	-0.161	1.118
VDR	29.507	29.514	28.490	28.525	11.081	10.367	10.836	9.691	-0.714	1.640	-0.245	1.185	-1.390	2.621
VLDLR	27.937	32.904	31.762	32.093	9.511	13.757	14.108	13.259	4.246	0.053	4.597	0.041	3.748	0.074
XDH	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ZFP36	25.707	26.643	24.515	25.887	7.281	7.496	6.861	7.053	0.215	0.862	-0.420	1.338	-0.228	1.171
ZHX3	26.753	26.305	26.008	26.393	8.327	7.158	8.354	7.559	-1.169	2.249	0.027	0.981	-0.768	1.703
ZNF281	23.573	23.857	22.336	23.665	5.147	4.710	4.682	4.831	-0.437	1.354	-0.465	1.380	-0.316	1.245
ACTB	14.330	14.828	13.138	14.548	-4.096	-4.319	-4.516	-4.286						
B2M	18.426	19.147	17.654	18.834	0.000	0.000	0.000	0.000						
GAPDH	16.544	17.793	15.669	16.935	-1.882	-1.354	-1.985	-1.899						
HPRT1	19.452	20.615	18.679	20.706	1.026	1.468	1.025	1.872						
RPLPO	15.746	16.821	15.169	15.785	-2.680	-2.326	-2.485	-3.049						
HGDC	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!						
RTC	22.619	22.346	22.496	23.181	4.193	3.199	4.842	4.347						
RTC	22.626	22.362	22.621	23.201	4.200	3.215	4.967	4.367						
RTC	22.662	22.313	22.484	23.114	4.236	3.166	4.830	4.280						
PPC	18.253	18.442	17.960	18.476	-0.173	-0.705	0.306	-0.358						
PPC	18.527	18.474	18.434	18.446	0.101	-0.673	0.780	-0.388						
PPC	18.410	18.623	18.515	18.482	-0.016	-0.524	0.861	-0.352						

**Условные обозначения:**

**Gene** – ген

**Ct values** – значения Ct

**Pred** - Преднизолон

**#VALUE!** - #ЗНАЧЕНИЕ!

**Combo** - Комбинация

**Fold change** – кратность изменения

**Undetermined** – не определено

Таблица 4е. Значения Ct и кратность изменений на основе анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR для клеточной линии RI.

Gene	Ct Values				ΔCt (B2M)				Cpd44		Pred		Combo	
	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	ΔACT	Fold Change	ΔACT	Fold Change	ΔACT	Fold Change
ADARB1	27.745	26.650	28.557	28.623	8.964	7.292	9.377	9.377	-1.672	3.187	0.413	0.751	0.413	0.751
AFF1	28.249	26.820	27.258	26.977	9.468	7.462	8.078	7.731	-2.006	4.017	-1.390	2.621	-1.737	3.333
AK2	19.425	20.270	20.510	21.466	0.644	0.912	1.330	2.220	0.268	0.830	0.686	0.622	1.576	0.335
AMPD3	27.499	27.191	27.354	27.238	8.718	7.833	8.174	7.992	-0.885	1.847	-0.544	1.458	-0.726	1.654
ANGPTL4	30.178	29.820	32.245	29.596	11.397	10.462	13.065	10.350	-0.935	1.912	1.668	0.315	-1.047	2.066
ANXA4	24.380	24.395	24.910	24.771	5.599	5.037	5.730	5.525	-0.562	1.476	0.131	0.913	-0.074	1.053
AQP1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	33.328	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	14.082	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ARID5B	27.976	27.333	29.208	28.495	9.195	7.975	10.028	9.249	-1.220	2.329	0.833	0.561	0.054	0.963
ASPH	22.413	23.466	23.583	24.410	3.632	4.108	4.403	5.164	0.476	0.719	0.771	0.586	1.532	0.346
ATF4	17.689	18.269	19.452	20.540	-1.092	-1.089	0.272	1.294	0.003	0.998	1.364	0.389	2.386	0.191
BCL6	19.449	20.289	20.785	20.772	0.668	0.931	1.605	1.526	0.263	0.833	0.937	0.522	0.858	0.552
BMPER	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CALCR	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPA	Undetermined	36.511	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	17.153	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPB	23.192	23.765	26.229	27.211	4.411	4.407	7.049	7.965	-0.004	1.003	2.638	0.161	3.554	0.085
COL4A2	31.978	31.782	Undetermined	35.212	13.197	12.424	#VALUE!	15.966	-0.773	1.709	#VALUE!	#VALUE!	2.769	0.147
CREB1	22.435	23.217	23.317	23.470	3.654	3.859	4.137	4.224	0.205	0.868	0.483	0.715	0.570	0.674
CREB3	23.790	24.178	24.951	24.735	5.009	4.820	5.771	5.489	-0.189	1.140	0.762	0.590	0.480	0.717
CREB3L4	23.683	23.500	24.211	23.870	4.902	4.142	5.031	4.624	-0.760	1.693	0.129	0.914	-0.278	1.213
CTGF	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CYB561	39.352	38.452	38.088	37.618	20.571	19.094	18.908	18.372	-1.477	2.784	-1.663	3.167	-2.199	4.592
DDIT4	21.641	22.679	23.471	22.583	2.860	3.321	4.291	3.337	0.461	0.726	1.431	0.371	0.477	0.718
DIRA52	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DUSP1	25.166	25.422	25.412	24.981	6.385	6.064	6.232	5.735	-0.321	1.249	-0.153	1.112	-0.650	1.569
EDN1	32.446	31.815	39.440	30.700	13.665	12.457	20.260	11.454	-1.208	2.310	6.595	0.010	-2.211	4.630
EHD3	24.957	24.572	25.411	23.975	6.176	5.214	6.231	4.729	-0.962	1.948	0.055	0.963	-1.447	2.726
ERRF1	Undetermined	31.705	32.655	31.791	#VALUE!	12.347	13.475	12.545	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
FKBP5	20.792	21.757	20.858	20.881	2.011	2.399	1.678	1.635	0.388	0.764	-0.333	1.260	-0.376	1.298
FOSL2	31.458	30.761	34.157	36.459	12.677	11.403	14.977	17.213	-1.274	2.418	2.300	0.203	4.536	0.043
GDPD1	27.589	27.394	28.699	28.110	8.808	8.036	9.519	8.864	-0.772	1.708	0.711	0.611	0.056	0.962
GHRHR	Undetermined	37.546	33.555	29.797	#VALUE!	18.188	14.375	10.551	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
GLUL	30.775	28.738	32.181	32.961	11.994	9.380	13.001	13.715	-2.614	6.122	1.007	0.498	1.721	0.303
GOT1	21.489	22.584	23.355	24.551	2.708	3.226	4.175	5.305	0.518	0.698	1.467	0.362	2.597	0.165
H6PD	25.108	25.012	26.442	24.742	6.327	5.654	7.262	5.496	-0.673	1.594	0.935	0.523	-0.831	1.779

HAS2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
HNRPLL	21.958	22.844	23.146	24.289	3.177	3.486	3.966	5.043	0.309	0.807	0.789	0.579	1.866	0.274
IL10	32.353	31.498	32.669	Undetermined	13.572	12.140	13.489	#VALUE!	-1.432	2.698	-0.083	1.059	#VALUE!	#VALUE!
IL1RN	29.709	28.405	29.300	29.204	10.928	9.047	10.120	9.958	-1.881	3.683	-0.808	1.751	-0.970	1.959
IL6	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6R	29.184	29.246	30.468	31.321	10.403	9.888	11.288	12.075	-0.515	1.429	0.885	0.541	1.672	0.314
KLF13	22.843	22.854	23.590	23.322	4.062	3.496	4.410	4.076	-0.566	1.480	0.348	0.786	0.014	0.990
KLF9	34.469	Undetermined	Undetermined	Undetermined	15.688	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
LOX	33.918	33.915	34.185	33.948	15.137	14.557	15.005	14.702	-0.580	1.495	-0.132	1.096	-0.435	1.352
MERTK	34.533	30.691	Undetermined	31.272	15.752	11.333	#VALUE!	12.026	-4.419	21.392	#VALUE!	#VALUE!	-3.726	13.232
MT1E	Undetermined	34.215	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	14.857	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT2A	23.125	24.279	25.180	25.570	4.344	4.921	6.000	6.324	0.577	0.670	1.656	0.317	1.980	0.253
NFKB1A	22.279	23.710	23.531	23.442	3.498	4.352	4.351	4.196	0.854	0.553	0.853	0.554	0.698	0.616
NR3C1	21.972	22.616	23.323	23.237	3.191	3.258	4.143	3.991	0.067	0.955	0.952	0.517	0.800	0.574
PDCD7	23.823	24.406	24.616	24.925	5.042	5.048	5.436	5.679	0.006	0.996	0.394	0.761	0.637	0.643
PDGFRB	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PDP1	25.799	25.387	26.940	25.667	7.018	6.029	7.760	6.421	-0.989	1.985	0.742	0.598	-0.597	1.513
PER1	24.531	25.492	27.160	26.707	5.750	6.134	7.980	7.461	0.384	0.766	2.230	0.213	1.711	0.305
PER2	24.162	24.378	24.811	24.547	5.381	5.020	5.631	5.301	-0.361	1.284	0.250	0.841	-0.080	1.057
PIK3R1	22.958	23.908	24.331	24.602	4.177	4.950	5.151	5.356	0.373	0.772	0.974	0.509	1.179	0.442
PLD1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PLEKHF1	29.893	30.520	31.367	34.212	11.112	11.162	12.187	14.966	0.050	0.966	1.075	0.475	3.854	0.069
POU2F1	23.693	24.243	25.222	25.607	4.912	4.885	6.042	6.361	-0.027	1.019	1.130	0.457	1.449	0.366
POU2F2	21.776	21.769	22.972	22.359	2.995	2.411	3.792	3.113	-0.584	1.499	0.797	0.576	0.118	0.921
RASA3	25.711	26.279	27.653	26.571	6.930	6.921	8.473	7.325	-0.009	1.006	1.543	0.343	0.395	0.760
RGS2	25.306	25.721	26.477	28.212	6.525	6.363	7.297	8.966	-0.162	1.119	0.772	0.586	2.441	0.184
RHOB	Undetermined	Undetermined	Undetermined	38.682	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	19.436	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
RHOJ	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
SESN1	25.545	24.425	21.882	20.973	6.764	5.067	2.702	1.727	-1.697	3.242	-4.062	16.703	-5.037	32.831
SGK1	24.884	26.262	26.131	26.411	6.103	6.904	6.951	7.165	0.801	0.574	0.848	0.556	1.062	0.479
SLC10A6	35.730	Undetermined	34.404	35.950	16.949	#VALUE!	15.224	16.704	#VALUE!	#VALUE!	-1.725	3.306	-0.245	1.185
SLC19A2	25.756	25.536	26.202	25.342	6.975	6.178	7.022	6.096	-0.797	1.737	0.047	0.968	-0.879	1.839
SLC22A5	32.280	Undetermined	Undetermined	38.888	13.499	#VALUE!	#VALUE!	19.642	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	6.143	0.014
SNTA1	24.937	25.554	26.480	26.133	6.156	6.196	7.300	6.887	0.040	0.973	1.144	0.453	0.731	0.602
SPHK1	31.323	31.119	34.340	Undetermined	12.542	11.761	15.160	#VALUE!	-0.781	1.718	2.618	0.163	#VALUE!	#VALUE!
SPSB1	26.573	26.285	28.977	28.200	7.792	6.927	9.797	8.954	-0.865	1.821	2.005	0.249	1.162	0.447
STAT5A	22.191	22.769	23.379	22.666	3.410	3.411	4.199	3.420	0.001	0.999	0.789	0.579	0.010	0.993
STAT5B	22.200	22.683	23.111	23.737	3.419	3.325	3.931	4.491	-0.094	1.067	0.512	0.701	1.072	0.476

TBU1XR1	20.394	21.663	21.587	21.692	1.613	2.305	2.407	2.446	0.692	0.619	0.794	0.577	0.833	0.561
TNF	24.972	24.712	24.773	22.812	6.191	5.354	5.593	3.556	-0.837	1.786	-0.598	1.514	-2.625	6.169
TNFAIP3	25.433	26.896	27.393	28.474	6.652	7.538	8.213	9.228	0.886	0.541	1.561	0.339	2.576	0.168
TSC22D3	22.534	23.300	21.502	21.179	3.753	3.942	2.322	1.933	0.189	0.877	-1.431	2.696	-1.820	3.531
USP2	20.982	21.420	20.720	20.616	2.201	2.062	1.540	1.370	-0.139	1.101	-0.661	1.581	-0.831	1.779
USP54	26.748	26.364	27.638	26.992	7.967	7.006	8.458	7.746	-0.961	1.947	0.491	0.712	-0.221	1.166
VDR	29.817	27.736	31.463	29.508	11.036	8.378	12.283	10.262	-2.658	6.312	1.247	0.421	-0.774	1.710
VLDLR	35.442	Undetermined	33.979	Undetermined	16.661	#VALUE!	14.799	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	-1.862	3.635	#VALUE!	#VALUE!
XDH	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ZFP36	23.833	24.374	25.160	24.997	5.052	5.016	5.980	5.751	-0.036	1.025	0.928	0.526	0.699	0.616
ZHX3	24.547	29.785	25.114	24.601	5.766	10.427	5.934	5.355	4.661	0.040	0.168	0.890	-0.411	1.330
ZNF281	23.044	23.667	23.814	23.669	4.263	4.309	4.634	4.423	0.046	0.969	0.371	0.773	0.160	0.895
ACTB	14.794	15.664	15.466	15.976	-3.987	-3.694	-3.714	-3.270						
B2M	18.781	19.358	19.180	19.246	0.000	0.000	0.000	0.000						
GAPDH	15.388	15.720	16.234	17.444	-3.393	-3.638	-2.946	-1.802						
HPRT1	21.297	22.013	21.626	22.777	2.516	2.655	2.446	3.531						
RPLPO	15.092	14.837	15.994	15.962	-3.689	-4.521	-3.186	-3.284						
HGDC	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!						
RTC	20.832	21.659	20.818	20.383	2.051	2.301	1.638	1.137						
RTC	20.752	21.713	20.681	20.380	1.971	2.355	1.501	1.134						
RTC	20.792	21.629	20.780	20.481	2.011	2.271	1.600	1.235						
PPC	18.493	18.197	18.424	18.380	-0.288	-1.161	-0.756	-0.866						
PPC	18.567	18.303	18.491	18.255	-0.214	-1.055	-0.689	-0.991						
PPC	18.444	18.435	18.381	18.325	-0.337	-0.923	-0.799	-0.921						

**Условные обозначения:**

**Gene** – ген

**Ct values** – значения Ct

**Pred** - Преднизолон

**#VALUE!** - #ЗНАЧЕНИЕ!

**Combo** - Комбинация

**Fold change** – кратность изменения

**Undetermined** – не определено



Таблица 4f. Значения Ct и кратность изменений на основе анализа экспрессии панели генов сигнального пути глюкокортикоидов с применением RT2 PCR для клеточной линии SUDHL4.

Gene	Ct Values				ΔCt (B2M)				Cpd44		Pred		Combo	
	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	DMSO	Cpd44	Pred	Combo	ΔACT	Fold Change	ΔACT	Fold Change	ΔACT	Fold Change
ADARB1	27.696	28.562	27.634	28.373	10.107	8.878	9.591	8.992	-1.229	2.344	-0.516	1.430	-1.115	2.166
AFF1	26.492	25.936	25.874	25.660	7.394	7.118	6.965	7.788	-0.276	1.211	-0.429	1.346	0.394	0.761
AK2	19.861	20.311	20.602	20.682	2.416	1.846	1.340	1.157	-0.570	1.485	-1.076	2.108	-1.259	2.393
AMPD3	25.234	25.553	24.780	25.739	7.473	6.024	6.582	6.530	-1.449	2.730	-0.891	1.854	-0.943	1.923
ANGPTL4	29.764	29.825	29.326	30.167	11.901	10.570	10.854	11.060	-1.331	2.516	-1.047	2.066	-0.841	1.791
ANXA4	26.847	28.717	26.973	28.902	10.636	8.217	9.746	8.143	-2.419	5.348	-0.890	1.853	-2.493	5.629
AQP1	Undetermined	Undetermined	32.982	32.161	13.895	14.226	#VALUE!	#VALUE!	0.331	0.795	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ARID5B	25.120	25.129	24.504	24.555	6.289	5.748	6.158	6.416	-0.541	1.455	-0.131	1.095	0.127	0.916
ASPH	22.618	23.348	22.741	23.094	4.828	3.985	4.377	3.914	-0.843	1.794	-0.451	1.367	-0.914	1.884
ATF4	19.323	18.778	18.988	18.352	0.086	0.232	-0.193	0.619	0.146	0.904	-0.279	1.213	0.533	0.691
BCL6	20.521	21.075	20.634	21.163	2.897	1.878	2.104	1.817	-1.019	2.027	-0.793	1.733	-1.080	2.114
BMPER	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CALCR	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CEBPA	28.837	31.206	28.782	30.802	12.536	10.026	12.235	10.133	-2.510	5.696	-0.301	1.232	-2.403	5.289
CEBPB	24.507	23.911	23.944	22.678	4.412	5.188	4.940	5.803	0.776	0.584	0.528	0.694	1.391	0.381
COL4A2	Undetermined	Undetermined	Undetermined	33.904	15.638	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CREB1	22.906	22.973	22.993	22.316	4.550	4.237	4.002	4.202	-0.313	1.242	-0.548	1.462	-0.348	1.273
CREB3	24.330	24.566	24.421	24.421	6.155	5.665	5.595	5.626	-0.490	1.404	-0.560	1.474	-0.529	1.443
CREB3L4	24.709	25.089	24.418	24.583	6.317	5.662	6.118	6.005	-0.655	1.575	-0.199	1.148	-0.312	1.241
CTGF	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
CYB561	33.993	36.737	33.006	36.752	18.486	14.250	17.766	15.289	-4.236	18.844	-0.720	1.647	-3.197	9.170
DDIT4	21.247	21.455	21.854	22.681	4.415	3.098	2.484	2.543	-1.317	2.491	-1.931	3.813	-1.872	3.660
DIRAS2	Undetermined	Undetermined	33.382	Undetermined	#VALUE!	14.626	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
DUSP1	26.436	26.325	26.754	26.713	8.447	7.998	7.354	7.732	-0.449	1.365	-1.093	2.133	-0.715	1.641
EDN1	32.440	33.297	32.372	Undetermined	#VALUE!	13.616	14.326	13.736	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
EHD3	24.298	25.766	24.878	26.386	8.120	6.122	6.795	5.594	-1.998	3.994	-1.325	2.505	-2.526	5.760
ERRF1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
FKBP5	20.533	20.494	21.869	21.371	3.105	3.113	1.523	1.829	0.008	0.994	-1.582	2.994	-1.276	2.422
FOSL2	35.083	31.757	33.362	Undetermined	#VALUE!	14.606	12.786	16.379	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
GDPD1	27.358	28.134	26.972	27.838	9.572	8.216	9.163	8.654	-1.356	2.560	-0.409	1.328	-0.918	1.889
GHRHR	36.313	37.623	Undetermined	36.734	18.468	#VALUE!	18.652	17.609	#VALUE!	#VALUE!	0.184	0.880	-0.859	1.814
GLUL	35.436	35.795	34.414	Undetermined	#VALUE!	15.658	16.824	16.732	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
GOT1	22.400	22.607	22.859	22.304	4.038	4.103	3.636	3.696	0.065	0.956	-0.402	1.321	-0.342	1.268

H6PD	25.209	25.743	24.819	24.878	6.612	6.063	6.772	6.505	-0.549	1.463	0.160	0.895	-0.107	1.077
HAS2	Undetermined	35.628	31.961	Undetermined	#VALUE!	13.205	16.657	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
HNRPLL	22.667	22.977	22.577	22.558	4.292	3.821	4.006	3.963	-0.471	1.386	-0.286	1.219	-0.329	1.256
IL10	32.210	33.099	31.119	32.524	14.258	12.363	14.128	13.506	-1.895	3.719	-0.130	1.094	-0.752	1.684
IL1RN	Undetermined	Undetermined	36.259	Undetermined	#VALUE!	17.503	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
IL6R	32.607	33.589	31.995	33.408	15.142	13.239	14.618	13.903	-1.903	3.740	-0.524	1.438	-1.239	2.360
KLF13	22.256	22.649	22.834	22.878	4.612	4.078	3.678	3.552	-0.534	1.448	-0.934	1.911	-1.060	2.085
KLF9	26.816	27.456	26.769	27.572	9.306	8.013	8.485	8.112	-1.293	2.450	-0.821	1.767	-1.194	2.288
LOX	33.947	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	15.243	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MERTK	33.257	Undetermined	33.859	31.392	13.126	15.103	#VALUE!	14.553	1.977	0.254	#VALUE!	#VALUE!	1.427	0.372
MT1E	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
MT2A	23.416	24.175	23.522	23.341	5.075	4.766	5.204	4.712	-0.309	1.239	0.129	0.914	-0.363	1.286
NFKBIA	22.744	22.909	23.016	22.914	4.648	4.260	3.938	4.040	-0.388	1.309	-0.710	1.636	-0.608	1.524
NR3C1	22.602	22.803	22.781	22.525	4.259	4.025	3.832	3.898	-0.234	1.176	-0.427	1.344	-0.361	1.284
PDCD7	23.859	24.858	24.113	23.750	5.484	5.357	5.887	5.155	-0.127	1.092	0.403	0.756	-0.329	1.256
PDGFRB	Undetermined	Undetermined	35.205	Undetermined	#VALUE!	16.449	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PDP1	25.255	26.112	25.507	25.928	7.662	6.751	7.141	6.551	-0.911	1.880	-0.521	1.435	-1.111	2.160
PER1	24.612	24.926	24.973	25.007	6.741	6.217	5.955	5.908	-0.524	1.438	-0.786	1.724	-0.833	1.781
PER2	23.794	24.371	24.403	24.767	6.501	5.647	5.400	5.090	-0.854	1.808	-1.101	2.145	-1.411	2.659
PIK3R1	23.210	23.440	23.615	23.627	5.361	4.859	4.469	4.506	-0.502	1.416	-0.892	1.856	-0.855	1.809
PLD1	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
PLEKHF1	27.292	27.868	27.684	28.448	10.182	8.928	8.897	8.588	-1.254	2.385	-1.285	2.437	-1.594	3.019
POU2F1	23.799	24.224	23.866	23.951	5.685	5.110	5.253	5.095	-0.575	1.490	-0.432	1.349	-0.590	1.505
POU2F2	21.502	21.920	21.841	21.890	3.624	3.085	2.949	2.798	-0.539	1.453	-0.675	1.597	-0.826	1.773
RASA3	22.754	23.207	22.984	23.225	4.959	4.228	4.236	4.050	-0.731	1.660	-0.723	1.651	-0.909	1.878
RGS2	24.883	25.145	24.670	24.812	6.546	5.914	6.174	6.179	-0.632	1.550	-0.372	1.294	-0.367	1.290
RHOB	30.760	32.584	30.084	31.155	12.889	11.328	13.613	12.056	-1.561	2.951	0.724	0.605	-0.833	1.781
RHOJ	Undetermined	Undetermined	38.493	Undetermined	#VALUE!	19.737	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
SESN1	22.189	Undetermined	25.195	26.963	8.697	6.439	#VALUE!	3.485	-2.258	4.783	#VALUE!	#VALUE!	-5.212	37.065
SGK1	25.886	25.808	26.513	25.449	7.183	7.757	6.837	7.182	0.574	0.672	-0.346	1.271	-0.001	1.001
SLC10A6	37.655	34.857	34.336	38.026	19.760	15.580	15.886	18.951	-4.180	18.126	-3.874	14.662	-0.809	1.752
SLC19A2	26.295	27.465	26.633	27.755	9.489	7.877	8.494	7.591	-1.612	3.057	-0.995	1.993	-1.898	3.727
SLC22A5	27.847	28.544	27.725	28.010	9.744	8.969	9.573	9.143	-0.775	1.711	-0.171	1.126	-0.601	1.517
SNTA1	24.008	24.797	24.422	24.779	6.513	5.666	5.826	5.304	-0.847	1.799	-0.687	1.610	-1.209	2.312
SPHK1	29.372	30.619	29.007	29.583	11.317	10.251	11.648	10.668	-1.066	2.094	0.331	0.795	-0.649	1.568
SPSB1	25.736	26.495	25.588	25.722	7.456	6.832	7.524	7.032	-0.624	1.541	0.068	0.954	-0.424	1.342

STAT5A	24.652	25.174	24.761	24.858	6.592	6.005	6.203	5.948	-0.587	1.502	-0.389	1.309	-0.644	1.563
STAT5B	21.986	22.153	21.908	21.716	3.450	3.152	3.182	3.282	-0.298	1.229	-0.268	1.204	-0.168	1.123
TBL1XR1	20.756	20.805	20.855	20.821	2.555	2.099	1.834	2.052	-0.456	1.372	-0.721	1.648	-0.503	1.417
TNF	27.723	29.337	29.509	31.477	13.211	10.753	10.366	9.019	-2.458	5.495	-2.845	7.185	-4.192	18.278
TNFAIP3	28.965	28.521	27.807	26.978	8.712	9.051	9.550	10.261	0.339	0.791	0.838	0.559	1.549	0.342
TSC22D3	21.819	21.432	23.384	22.896	4.630	4.628	2.461	3.115	-0.002	1.001	-2.169	4.497	-1.515	2.858
USP2	20.842	21.342	22.120	22.318	4.052	3.364	2.371	2.138	-0.688	1.611	-1.681	3.207	-1.914	3.769
USPS4	26.333	26.952	33.990	27.307	9.041	15.234	7.981	7.629	6.193	0.014	-1.060	2.085	-1.412	2.661
VDR	27.497	28.330	26.956	28.621	10.355	8.200	9.359	8.793	-2.155	4.454	-0.996	1.994	-1.562	2.953
VLDLR	30.410	28.792	27.824	26.896	8.630	9.068	9.821	11.706	0.438	0.738	1.191	0.438	3.076	0.119
XDH	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
ZFP36	24.716	24.706	24.770	24.542	6.276	6.014	5.735	6.012	-0.262	1.199	-0.541	1.455	-0.264	1.201
ZHX3	24.009	24.719	24.325	24.882	6.616	5.569	5.748	5.305	-1.047	2.066	-0.868	1.825	-1.311	2.481
ZNF281	23.423	23.881	23.813	23.935	5.669	5.057	4.910	4.719	-0.612	1.528	-0.759	1.692	-0.950	1.932
ACTB	13.717	14.247	14.284	14.272	-3.994	-4.472	-4.724	-4.987						
<i>B2M</i>	18.704	18.971	18.756	18.266	0.000	0.000	0.000	0.000						
GAPDH	15.435	15.835	15.790	15.782	-2.484	-2.966	-3.136	-3.269						
HPRT1	21.349	21.358	21.582	21.214	2.948	2.826	2.387	2.645						
RPLP0	15.192	15.469	15.266	15.194	-3.072	-3.490	-3.502	-3.512						
HGDC	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!						
RTC	21.372	21.163	21.388	21.673	3.407	2.632	2.192	2.668						
RTC	21.441	21.008	21.369	21.554	3.288	2.613	2.037	2.737						
RTC	21.504	21.137	21.357	21.500	3.234	2.601	2.166	2.800						
PPC	18.529	18.295	18.338	18.368	0.102	-0.418	-0.676	-0.175						
PPC	18.544	18.326	19.432	18.405	0.139	0.676	-0.645	-0.160						
PPC	18.784	18.935	18.081	18.679	0.413	-0.675	-0.036	0.080						

**Условные обозначения:**

**Gene** – ген

**Ct values** – значения Ct

**Pred** - Преднизолон

**#VALUE!** - #ЗНАЧЕНИЕ!

**Combo** - Комбинация

**Fold change** – кратность изменения

**Undetermined** – не определено

### **Пример 2.**

**Соединение 44 и эверолимус действуют синергически с целью усиления задержки клеточного цикла в G1-фазе в клетках WSU-DLCL2 с мутантным EZH2, апоптоза в клетках SU-DH-L5 с EZH2 дикого типа.**

На Фигуре 11 приведены панели В и Е, где каждая точка представляет собой среднее процентное содержание отсортированных клеток при раннем или позднем апоптозе (аннексин-V-положительные, среднее +/- S.D., n=3). На панелях С и F, точки кривой процесса представляют собой среднее процентное содержание отсортированных клеток по содержанию ДНК (PI-положительные, среднее +/- S.D., n=2). На панели А, клетки WSU-DLCL2 обрабатывали комбинацией соединения 44 и эверолимуса в стабильном соотношении 400:1. Было показано, что комбинация индуцирует очень сильный синергетический эффект со значениями CI 0,34-0,003. На панели В) приведены уровни апоптоза, оцененные для клеток WSU-DLCL2, обработанных соединением 44 (500 нМ), эверолимусом (5 нМ) или комбинацией в тех же концентрациях. Повышение уровня апоптоза клеток WSU-DLCL2 не наблюдалось. На панели С показано, что значительное повышение в G1-фазе клеточного цикла наблюдалось после совместной обработки, по сравнению с соединением 44 отдельно. На панели D клетки SU-DHL-5 в комбинации в стабильном соотношении 4000:3. Было показано, что комбинация индуцирует очень сильный синергетический эффект со значениями CI 0,135-0,008. На панели Е показано, что значительное повышение количества аннексин-положительных клеток определяли после совместной обработки (500 нМ соединения 44, 0,75 нМ эверолимуса), по сравнению с соединением 44 отдельно (p<0,0001). На панели F показано, что значительное повышение в «суб-G1»-фазе клеточного цикла наблюдалось после совместной обработки.

### **Пример 3**

**Соединение 44 и ибрутиниб действуют синергически с целью усиления апоптоза в клетках WSU-DLCL2 с мутантным EZH2, и в клетках SU-DH-L5 с EZH2 дикого типа.**

На Фигуре 12 приведены панели В и Е, где каждая точка представляет собой среднее процентное содержание отсортированных клеток при раннем или позднем апоптозе (аннексин-V-положительные, среднее +/- S.D., n=3). На панелях С и F, точки кривой процесса представляют собой среднее процентное содержание отсортированных клеток по содержанию ДНК (PI-положительные, среднее +/- S.D.,

n=2). На панели А, клетки WSU-DLCL2 обрабатывали комбинацией соединения 44 и ибрутиниба в стабильном соотношении 4:5. Для комбинации данных средств было продемонстрирован сильный синергический эффект со значениями CI от 0,39 до 0,14. На панели В приведены уровни апоптоза, оцененные для клеток WSU-DLCL2, обработанных соединением 44 (500 нМ), ибрутинибом (625 нМ) или в комбинации. В случае данной комбинации было выявлено синергическое, зависимое от времени повышение уровня апоптоза клеток WSU-DLCL2. На панели С показано, что в анализе клеточного цикла было выявлено зависимое от времени повышение процентного содержания клеток WSU-DLCL2 в G1-фазе с резким повышением после комбинированной обработки. На панели D, клетки SU-DHL-5 были обработаны соединением 44:ибрутинибом в стабильном соотношении 1:5. Комбинация индуцировала очень сильный синергический эффект со значениями CI 0,222-0,002. На панели Е показано синергическое и зависимое от времени повышение уровня аннексин-положительного окрашивания клеток SU-DHL-5 после совместной обработки соединением 44 (1000 нМ) и ибрутинибом (2500 нМ), по сравнению с соединением 44 отдельно ( $p < 0,0001$ ). На панели F показано, что в анализе клеточного цикла для клеток SU-DHL-5 было выявлено повышение количества клеток «суб-G1» популяции после совместной обработки, по сравнению с каждым средством отдельно.

#### **Пример 4**

**Соединение 44 и МК-2206 действуют синергически с целью усиления апоптоза в клетках WSU-DLCL2 с мутантным EZH2, и в клетках с EZH2 дикого типа (SU-DH-L5 и OCI-LY-19).**

На панели А из Фигуры 13, клетки WSU-DLCL2 обрабатывали комбинацией соединения 44 и МК-2206 в стабильном соотношении 4:1. График Fa-CI демонстрирует очень сильный синергический эффект со значениями CI 0,77-0,005. На панели В показано зависимое от времени повышение процентного содержания аннексин-положительных клеток WSU-DLCL2 при совместной обработке соединением 44 (2000 нМ) и МК-2206 (400 нМ). На панели С показано, что в анализе клеточного цикла было выявлено повышение процентного содержания клеток WSU-DLCL2 в G1-фазе с резким повышением после одного дня совместной обработки, по сравнению с соединением 44 отдельно ( $p < 0,0001$ ). На панели D, клетки SU-DHL-5 были обработаны соединением 44 и МК-2206 в стабильном соотношении 2:1. Комбинация индуцировала очень сильный синергический эффект со значениями CI 0,276-0,001. На панели Е показано, что при

оценке уровня апоптоза клеток SU-DHL-5 было выявлено повышение количества аннексин-положительных клеток после 24 часов совместной обработки (500 нМ соединения 44, 250 нМ МК-2206), по сравнению с соединением 44 отдельно ( $p < 0,0001$ ). На панели F показано, что в анализе клеточного цикла для клеток SU-DHL-5 количество клеток «суб-G1» популяции повышалось, по сравнению с обработкой каждым средством отдельно. На панели G показано, что в случае клеток OCI-LY19 при обработке комбинацией соединения 44 и МК-2206 наблюдался сильный синергический эффект со значением  $1/\alpha$  71,4. На панели H показано зависимое от времени повышение уровня апоптоза при обработке клеток OCI-LY19 комбинацией (1000 нМ соединение 44, 2500 нМ МК-2206), по сравнению с соединением 44 отдельно ( $p < 0,0001$ ). На панели I показано, что в анализе клеточного цикла для клеток OCI-LY19, обработанных комбинацией, было выявлено зависимое от времени повышение количества клеток в «суб-G1»-фазе клеточного цикла ( $p < 0,0001$ ).

#### **Пример 5**

**Регуляция целевых генов с помощью комбинаций соединения 44 и ингибиторов сигнального пути BCR.**

На панели A из фигуры 14 показаны результаты снижения уровня экспрессии EGR1 (в 40 раз) и FOS (в 4 раза) в случае комбинации соединения 44 и ибрутиниба, по сравнению с отдельными средствами в клетках WSU-DLCL2. На панели B показаны результаты повышения уровня экспрессии AICDA (в 3 раза) и TCL1A (в 5 раз) в случае комбинации соединения 44 и МК-2206, по сравнению с отдельными средствами в клетках WSU-DLCL2. На панели C показаны результаты повышения уровня экспрессии GJA1 (в 3 раза) в случае комбинации соединения 44 и ибрутиниба, по сравнению с отдельными средствами в клетках SU-DHL-5. Значение статистического анализа представляет собой среднее для двух повторностей или трех повторностей  $\pm$  SD. t-тест, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

#### **Пример 6**

**Синергические взаимодействия между ингибированием EZH2 и модулированием сигнального пути BCR, ингибирование BCL2 и GR агонизм в линиях В-клеток герминативного центра.**

Было обнаружено несколько комбинаций с синергическим эффектом для ключевых участников сигнальных путей, вовлеченных в биологию DLBCL (см. Фигуру 15). Ингибиторы, направленные на узловые точки сигнального пути с участием В-

клеточного рецептора, например, узловые точки сигнального каскада PI3K/Akt/mTOR, такие как MEK1/2 в рамках каскада MAPK, SYK и BTK, продемонстрировали очень сильный синергический эффект при комбинировании с EZP-6438, с расширением влияния ингибирования EZH2 от клеточных линий GCB с мутантным EZH2 до подтипов клеточных линий с EZH2 дикого типа. Ингибиторы белков семейства BCL-2, обатоклак, навитоклак и АВТ-199 продемонстрировали синергическую антипролиферативную активность в комбинации с соединением 44. Агонисты глюкокортикоидного рецептора, преднизолон и дексаметазон, проявили резкое усиление ингибирования EZH2 в мутантных клеточных линиях и клеточных линиях дикого типа, чувствительных к EZH2i. Ритуксимаб, антитело в комбинации с химиотерапевтическими средствами R-CHOP, направлено на cd-20 с целью антипролиферативных эффектов *in vitro* в мутантных клеточных линиях.

#### **Пример 7**

**Соединение 44 и эверолимус действуют синергетически с целью уменьшения популяций клеток в S и G2/M фазах в случае мутантных клеток WSU-DLCL2, и G1, S, и G2/M фазах в случае клеток SU-DHL-5 дикого типа.**

Клетки WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19 (данные не показаны) были предварительно обработаны соединением 44 (500 нМ в случае WSU и SU-DHL-5) с последующей совместной обработкой комбинацией соединения 44 и эверолимуса (WSU: 5нМ, SU-DHL-5: 0,75 нМ). На панели А из Фигуры 16 показано, что при обработке клеток WSU-DLCL2 отдельными средствами или в комбинации не наблюдалось никаких изменений в «суб-G1»-фазе клеточного цикла. На панелях В и С показано, что при обработке клеток WSU-DLCL2 наблюдалось зависимое от времени снижение количества клеток в S-фазе и G2/M-фазе клеточного цикла соответственно. На панелях D, E и F показано, что после 48 часов совместной обработки в случае клеток SU-DHL-5 наблюдалось синергическое снижение количества клеток в G1, S и G2/M-фазах клеточного цикла соответственно.

#### **Пример 8**

**Соединение 44 и ибрутиниб действуют синергетически с целью уменьшения популяций клеток в G1, S и G2/M-фазах в случае мутантных клеток WSU-DLCL2 и клеток SU-DHL-5 дикого типа.**

Клетки WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19 (данные не показаны) были предварительно обработаны соединением 44 (WSU: 500 нМ, SU-DHL-5: 1000нМ) с

последующей совместной обработкой комбинацией соединения 44 и ибрутиниба (WSU: 625 нМ, SU-DHL-5: 2500 нМ). На панелях А, В и С из Фигуры 17 показано, что после 24 часов совместной обработки клеток WSU-DLCL2 наблюдалось синергическое снижение количества клеток в G1, S и G2/М-фазах клеточного цикла соответственно, по сравнению с соединением 44 или ибрутинибом в качестве отдельных средств. На панелях D, E и F показано, что после совместной обработки клеток SU-DHL-5 наблюдалось зависимое от времени снижение количества клеток в G1, S-фазе и G2/М-фазах клеточного цикла соответственно, по сравнению с соединением 44 или ибрутинибом в качестве отдельных средств.

### **Пример 9**

**Соединение 44 и МК-2206 действуют синергетически с целью уменьшения популяций клеток в G1, S и G2/М-фазах в случае мутантных клеток WSU-DLCL2 и клеток SU-DHL-5 и OCI-LY19 дикого типа.**

Клетки WSU-DLCL2, SU-DHL-5 и OCI-LY19 были предварительно обработаны соединением 44 (2000 нМ, 500 нМ и 1000 нМ соответственно) с последующей совместной обработкой комбинацией соединения 44 и МК-2206 (400 нМ, 250 нМ и 2500 нМ соответственно). На панели А из Фигуры 18 показано, что при обработке клеток WSU-DLCL2 в комбинации с МК-2206 наблюдалось зависимое от времени снижение в G1-фазе. На панелях В и С показано, что при обработке клеток WSU-DLCL2 в комбинации наблюдалось синергическое снижение количества клеток в S и G2/М-фазах клеточного цикла соответственно. На панелях D, E и F показано, что после 48 часов совместной обработки в случае клеток SU-DHL-5 наблюдалось синергическое снижение количества клеток в G1, S и G2/М-фазах клеточного цикла соответственно, по сравнению с отдельными средствами. На панелях G, H и I показано, что при обработке клеток OCI-LY19 в комбинации наблюдалось зависимое от времени синергическое снижение количества клеток в G1, S и G2/М-фазах клеточного цикла соответственно.

В Таблице 5 приведены результаты исследований пролиферации с применением комбинации соединения 44 с отдельным SOC или другими выбранными средствами в отношении клеточных линий DLBCL с EZH2 дикого типа и с мутантным EZH2.



Таблица 5. Результаты исследования пролиферации.

	WSU-DLCL2		SU-DHL-10		SU-DHL-5		DOHH2	OCI-LY19	Toledo
соединение	CR	Диапазон CI или 1/a	CR	Диапазон CI или 1/a	CR	Диапазон CI или 1/a	1/a	1/a	1/a
преднизолон		9,7		4,2		7,6	9,5	4,2	Эффекта нет
дексаметазон		17 <sup>b</sup>		3,7	400:1	0,42-0,076	4,2	7,7	Эффекта нет
АВТ-199	4:3	0,27-0,002	3:200	1,2-1,4 <sup>e</sup>		Эффекта нет	1,9 <sup>b</sup>	4,20	1,9 <sup>b</sup>
навитоклакс	1:5	0,42-0,067	1:100	0,90-0,36 <sup>a</sup>		Эффекта нет	1,5 <sup>b</sup>	6,60	Эффекта нет
обатоклакс	40:3	1,10 <sup>e</sup>	1:1	0,91-1,36 <sup>e</sup>	320:1	1,26-1,61 <sup>e</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,50	1,1 <sup>b</sup>
ибрутиниб	4:5	0,39-0,14	1:10	0,78-0,062	1:5	0,22-0,002	0,67	Эффекта нет	Эффекта нет
иделалисиб	1:5	0,31-0,062	3:200	0,64-0,02	2:5	0,24- 0,000025	0,59	Эффекта нет	1,1
эверолимус	400:1	0,34-0,003	100:3	0,65-0,14	4000:3	0,14-0,008	0,83	Эффекта нет	Эффекта нет
Тамагиниб	1:5	0,24-0,025	3:50	1,1 <sup>e</sup> - 0,061	1:5	0,57-0,19	0,81	Эффекта нет	Эффекта нет
траметиниб	1:5	0,45-0,16		5,6 <sup>b</sup>	2:5	0,031-0,001	1,2 <sup>b</sup>	Эффекта нет	Эффекта нет
МК-2206	4:1	0,77-0,005	3:20	0,56-0,04	2:1	0,28-0,001	0,64	71,40	1,7 <sup>b</sup>
ритуксимаб		2,6							
бортезомиб	400:3	1,4-1,3 <sup>e</sup>	15:1	1,5-1 <sup>e</sup>	1600:1	1,00	0,96	1,67	0,96

CR=комбинационное соотношение, CI =  
комбинационный индекс

Диапазон значений CI выше  
значений 0,5 для фракции  
подавления

a-на основе одного эксперимента, в других экспериментах сдвиг значений IC<sub>50</sub> между наибольшей концентрацией 6438 и лекарственного средства отдельно, поскольку в случае соединения 44 50% ингибирование не достигалось.

b-не возможно было рассчитать альфа-значение, поэтому  
регистрировали сдвиг IC<sub>50</sub>

c- данные по DOHH2 нормализованы относительно отдельных  
концентраций 6438 вместо DMSO

d- концентрации ритуксимаба представлены в мкг/мл

e- данные значения CI не характеризовались значимой разницей  
относительно 1

Эффективность соединений, применяемых в анализах пролиферации, и диапазоны доз, применяемые для каждой клеточной линии, приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Эффективность соединения и диапазоны доз.

	Подтип GCB с EZH2 Y646F				Подтип GCB с EZH2 дикого типа							
	WSU-DLCL2		SU-DHL-10		SU-DHL-5		DONH-2		OCI-LY19		Toledo	
	Эффективность (нМ)	Диапазон концентрации лекарственного средства (нМ)	Эффективность (нМ)	Диапазон концентрации лекарственного средства (нМ)	Эффективность (нМ)	Диапазон концентрации лекарственного средства (нМ)	Эффективность (нМ)	Диапазон концентрации лекарственного средства (нМ)	Эффективность (нМ)	Диапазон концентрации лекарственного средства (нМ)	Эффективность (нМ)	Диапазон концентрации лекарственного средства (нМ)
преднизолон	90,6	7,8-1000	>1000	7,8-1000	39	0,625-80	133	7,8-1000	47	0,78-100	>1000	7,8-1000
дексаметазон	>10000	0,78-100	>100	0,78-100	3,4	0,078-10	5,6	1,56-200	79	0,078-10	>100	0,78-100
АВТ-199	1942	23,4-3000	3037	78-10000	>10000	78-10000	77	7,8-1000	53	1,56-200	190	4,69-600
навитоклак	3539	78-10000	>10000	78-10000	>10000	78-10000	540	78-10000	131	15,6-2000	590	11,7-1500
обатоклак	59	1,2-50	19,5	0,78-100	9,8	0,39-50	51	1,56-200	42	1,56-200	96	1,17-150
ибрутиниб	277,7	39-5000	1146	187-3000	1327	312-5000	956	39-5000	>10000	78-10000	>10000	78-10000
иделалисиб	2046	78-10000	8433	1250-10000	2587	78-10000	2984	78-10000	>10000	78-10000	9796	78-10000
эверолимус	0,653	0,039-5	0,854	0,09-6	0,72	0,09-3	0,13	0,078-5	ND	7,8-1000	0,1	0,078-10
Таматиниб	3415,2	78-10000	2214	312,5-5000	3761	313-10000	1209	78-10000	>10000	78-10000	3200	78-10000
граметиниб	8608	78-10000	>10000	78-10000	>10000	78-10000	>10000	78-10000	ND (*>10000 prism)	78-10000	>10000	78-10000
МК-2206	127	7,8-500	274,6	7,8-500	162	7,8-1000	86	7,8-1000	304	78-1000	95	7,8-1000
ритуксимаб	>10 <sup>a</sup>	10-0,39 <sup>a</sup>										
бортезомиб	6,5	0,94-7,5	8,6	5,0-20	4	0,04-5	6,6	0,078-10	12	0,23-30	4,3	0,12-15
Соединение 44	310	31-2000	73	3,1-200	3300	62-4000	>10000	31,3-2000	>10000	125-8000	>10000	15,6-1000

а- концентрации

ритуксимаба

представлены в мкг/мл

Приведенные значения IC<sub>50</sub> рассчитывали после 3 дней

введения дозы, за исключением Toledo, в случае которых

дозу вводили в течение 5 дней.

IC<sub>50</sub> соединения 44 рассчитывали после 7 дней для всех клеточных

линий, за исключением Toledo, в случае которых дозу вводили в

течение 11 дней.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПРИ ПОМОЩИ ССЫЛКИ

Все публикации и патентные документы, процитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ с помощью ссылки, как если бы

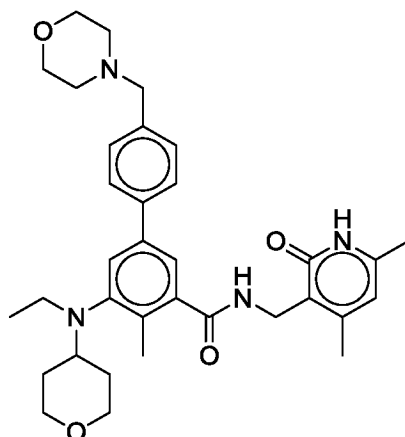
каждая(каждый) из такой публикации или документа была(был) конкретно и отдельно указана(указан) как включенная(включенный) с помощью ссылки. Упоминание публикаций и патентных документов не подразумевает в качестве признания того, что любое такое упоминание имеет отношение к предшествующему уровню техники, так и не представляет собой любое признание в отношении их содержания или даты. Из настоящего изобретения, описанного посредством письменного описания, специалисту в данной области будет понятно, что настоящее изобретение на практике может быть реализовано в различных вариантах осуществления, и что вышеизложенные описание и примеры приведены в целях иллюстрации, а не ограничения прилагаемой формулы изобретения.

#### ЭКВИВАЛЕНТЫ

Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от идеи или основных характеристик. Поэтому вышеизложенные варианты осуществления нужно рассматривать скорее как иллюстративные, а не ограничивающие настоящее изобретение, описанное в данном документе. Таким образом, объем настоящего изобретения задан скорее приложенной формулой изобретения, а не вышеизложенным описанием, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон соответствия формулы изобретения, предназначены для включения в него.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 и терапевтически эффективного количества средства согласно стандарту лечения, где ингибитор EZH2 представляет собой Соединение 44 следующей формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Способ по п. 1, где онкологическое заболевание представляет собой неходжкинскую лимфому; или

где онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание с EZH2 дикого типа; или

где онкологическое заболевание характеризуется повышенным уровнем триметилирования по H3K27; или

где онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание, устойчивое к ингибитору EZH2 или не поддающееся лечению ингибитором EZH2.

3. Способ по любому из пп. 1-2, где средство согласно стандарту лечения представляет собой одно или несколько соединений, выбранных из группы, состоящей из ингибитора BCL или ингибитора BCR.

4. Способ по п. 3, где ингибитор BCL представляет собой навитоклакс, обатоклакс или АВТ-199; или

где ингибитор BCR представляет собой ингибитор сигнального каскада PI3K/Akt/mTOR; или

где ингибитор BCR представляет собой ритуксимаб, МК-2206, иделалисиб, траметиниб, таматаниб, эверолимус, VELCADE или ибрутиниб.

5. Способ по любому из п. 1-4, где ингибитор EZH2 и средство согласно стандарту лечения вводят одновременно или последовательно.

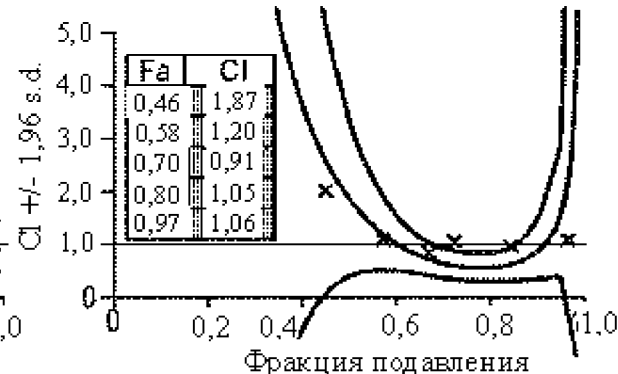
6. Способ отбора пациента для способа лечения по любому из пп. 1-5, где пациента отбирают исходя из профиля экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из Sestrin, TNF и GILZ.

**WSU-DLCL2 (Y646F)**

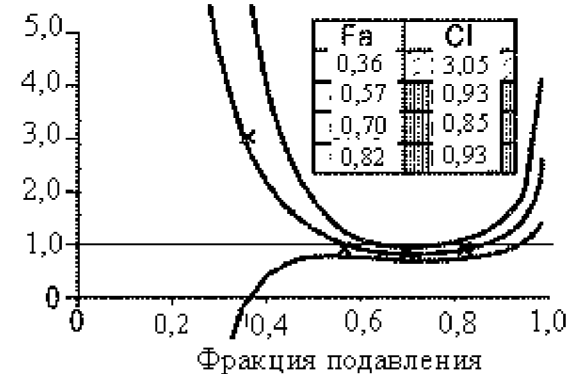
**A** Cpд 44 + доксорубин (50:1)



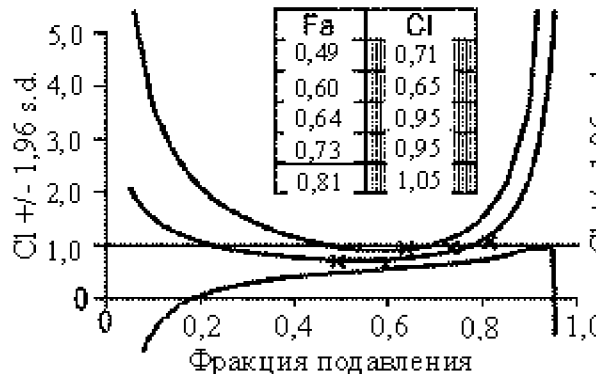
**B** Cpд 44 + винкристин (400:1)



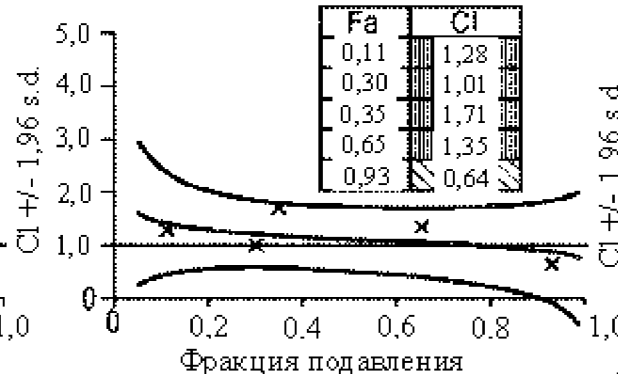
**C** Cpд 44 + мафос фамид (1:20)



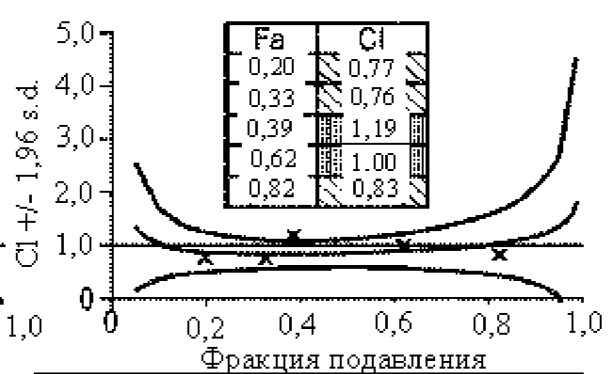
**D** Cpд 44 + доксорубин (10:3)



**E** Cpд 44 + винкристин (800:1)

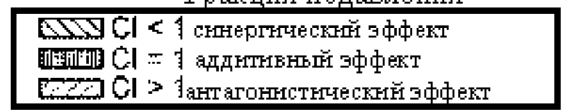


**F** Cpд 44 + мафос фамид (4:25)



**SU-DHL-10 (Y646F)**

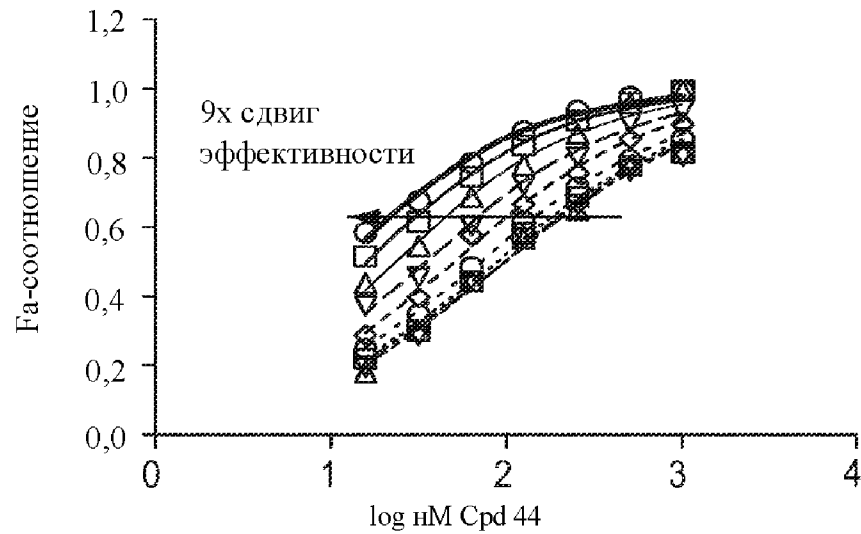
**ФИГ. 1**



**ФИГ. 2А**

**WSU-DLCL2 (Y646F)**

**Срд 44 + преднизолон**

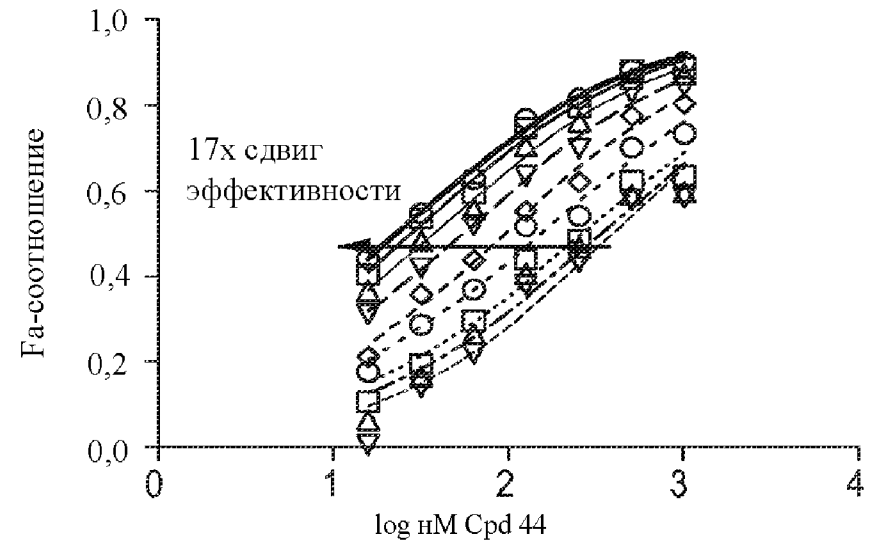


нМ преднизолона	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	0,0
EPZ-6438 IC60	18	26	38	58	83	121	150	162	167

○ □ △ ▽ ◆ ◇ ⊙ ⊠ ▲ ▼

**ФИГ. 2В**

**Срд 44 + дексаметазон**



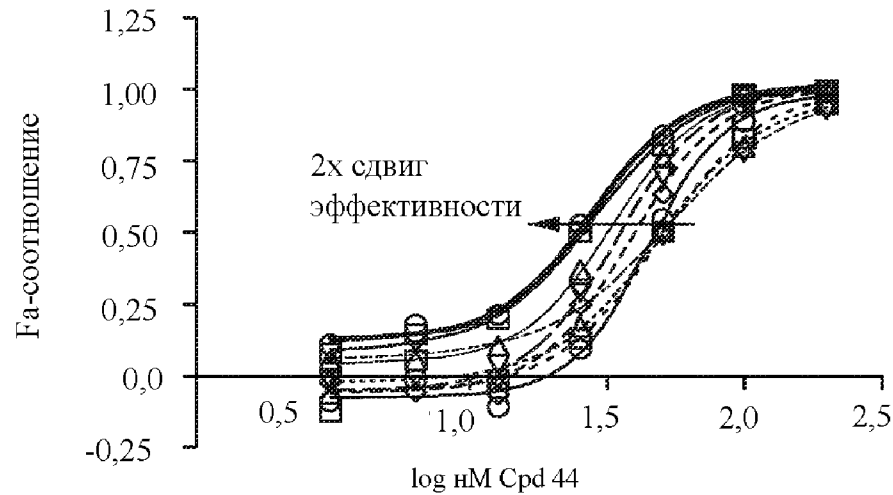
нМ дексаметазона	100	50	25	13	6,3	3,1	1,6	0,8	0,0
EPZ-6438 IC50	22	27	36	52	91	145	259	330	377

○ □ △ ▽ ◆ ◇ ⊙ ⊠ ▲ ▼

ФИГ. 2С

**SU-DHL-10 (Y646F)**

Срд 44 + преднизолон

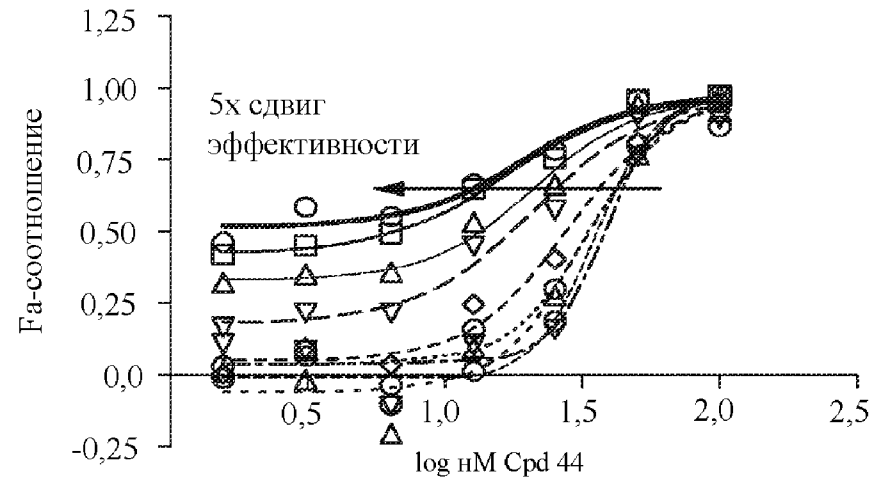


нМ преднизолона	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81	0
EPZ-6438 IC50	24	25	31	35	39	47	50	50	49

○ □ △ ▽ ◆ ◇ ⊖ ⊠ ▲ ▽

ФИГ. 2D

Срд 44 + дексаметазон



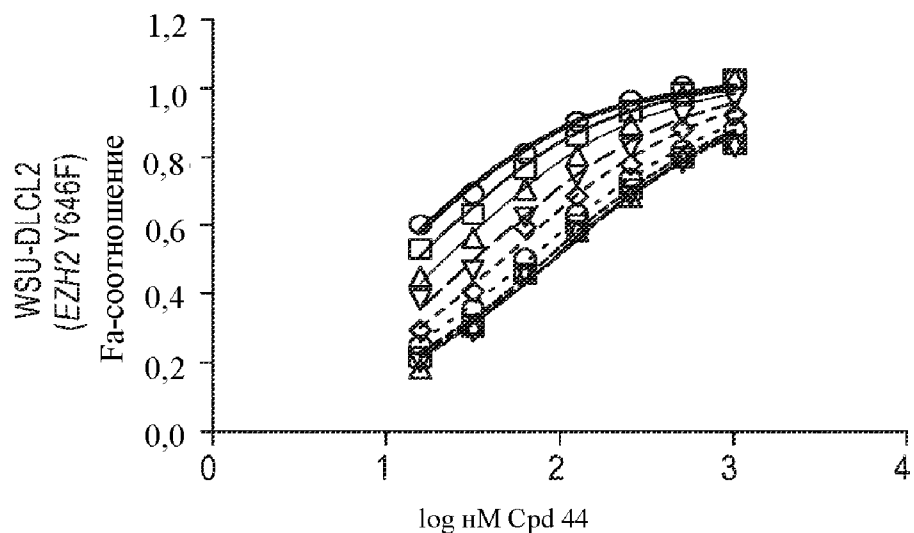
нМ дексаметазона	100	50	25	13	6,3	3,1	1,6	0,8	0,0
EPZ-6438 IC60	8	11	17	21	32	38	38	41	39

○ □ △ ▽ ◆ ◇ ⊖ ⊠ ▲ ▽



**ФИГ. 3А**

**Срд 44 + преднизолон**

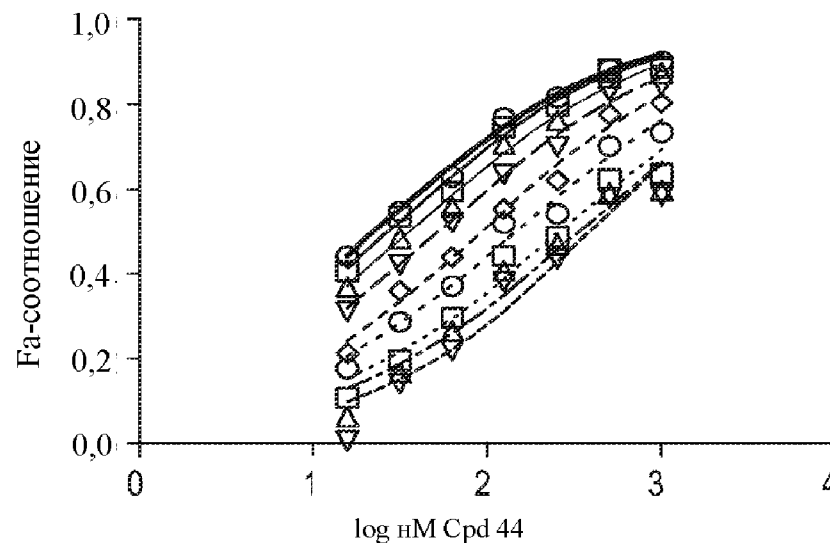


нМ преднизолона	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	0,0
Срд 44 EC60	11	16	23	34	49	69	85	94	95

○ □ △ ▽ ◆ ● ▣ ▤ ▥ ▦

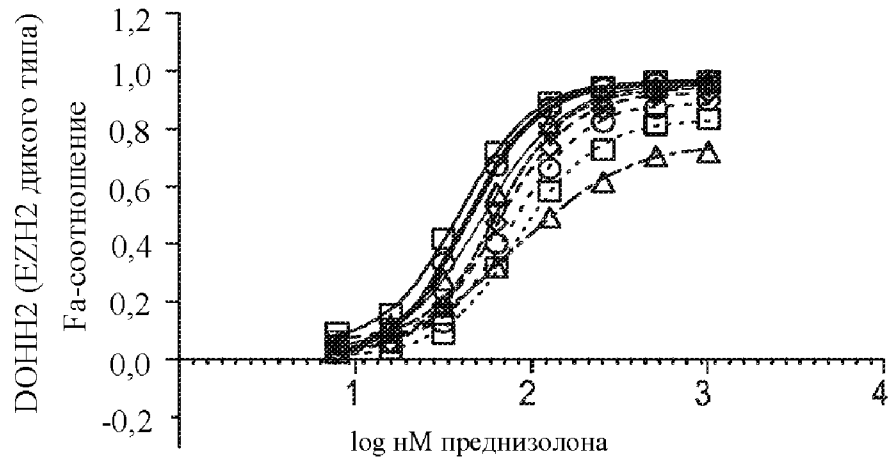
**ФИГ. 3В**

**Срд 44 + дексаметазон**

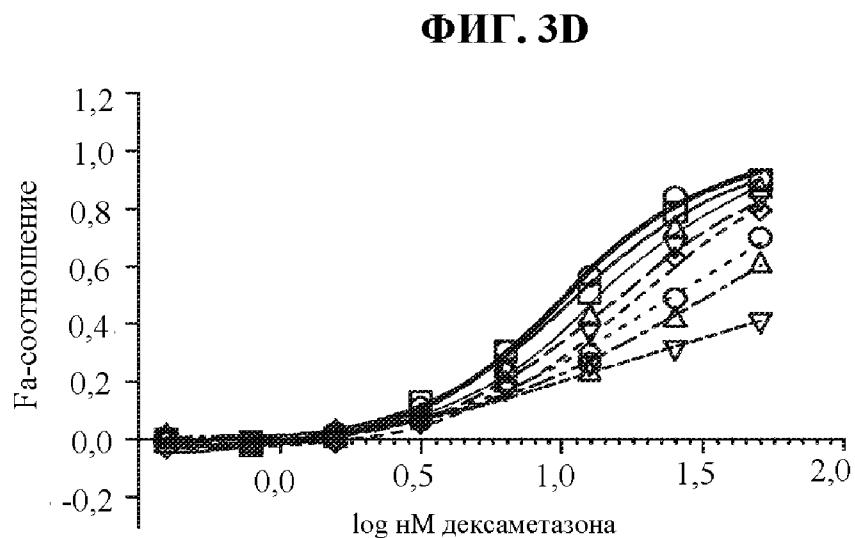


нМ дексаметазона	100	50	25	13	6,3	3,1	1,6	0,8	0,0
Срд 44 IC50	22	27	36	52	91	145	259	330	377

○ □ △ ▽ ◆ ● ▣ ▤ ▥ ▦



нМ CpD 44	10000	5000	2500	1250	625,0	313,0	156,0	0,0
EC50 преднизолонa	44	38	53	63	67	81	101	127



нМ CpD 44	10000	5000	2500	1250	625,0	313,0	156,0	0,0
Дексаметазонa IC40	8	9	10	12	14	17	22	44

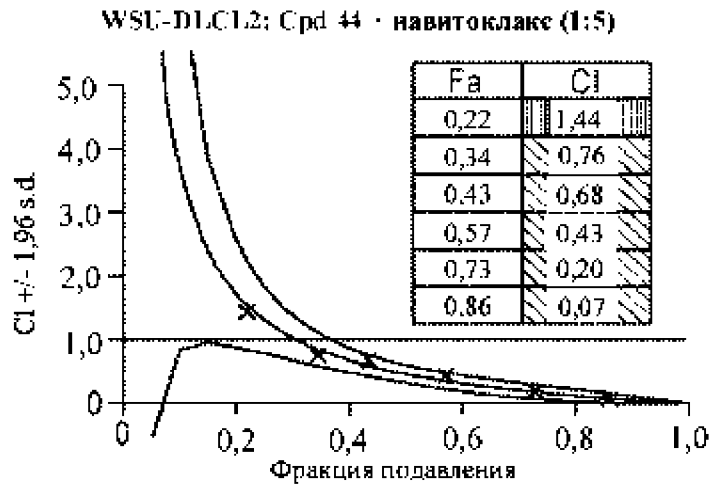
Клеточная линия	4 дня Срд44 IC <sub>50</sub> (мкМ)		7 дней Срд44 IC <sub>50</sub> (мкМ)		
	Срд 44 отдельно	Совместная обработка Срд 44	4 дня предварительной обработки Срд44/ 3 дня совместной обработки	4 дня предварительной обработки преднизолоном/ 3 дня совместной обработки	7 дней совместной обработки
WSU (Y646-Sens)	0,53 +/- 0,014	0,020 +/- 0,021	0,011 +/- 0,0062	>1	0,014 +/- 0,0049
SU-DHL10 (Y646-Sens)	0,64 +/- 0,26	0,0092 +/- 0,0044	0,0027 +/- 0,0013	0,52, >1	0,020 +/- 0,0057
RL (Y646-Res)	>1	0,0096 +/- 0,0066	<<0,004	0,38	<0,004
SU-DHL4 (Y646-Res)	>1	>1, 0,2, >1	0,035 +/- 0,043	>1	0,51 +/- 0,35
DOHH2 (WT)	>1	0,20 +/- 0,25	>1, 0,03, >1	>1	0,34 +/- 0,078
OCI-Ly19 (WT)	>1	0,19 +/- 0,11	0,0055 +/- 0,0047	>1	0,026, <0,004

**ФИГ. 4**

ФИГ. 5

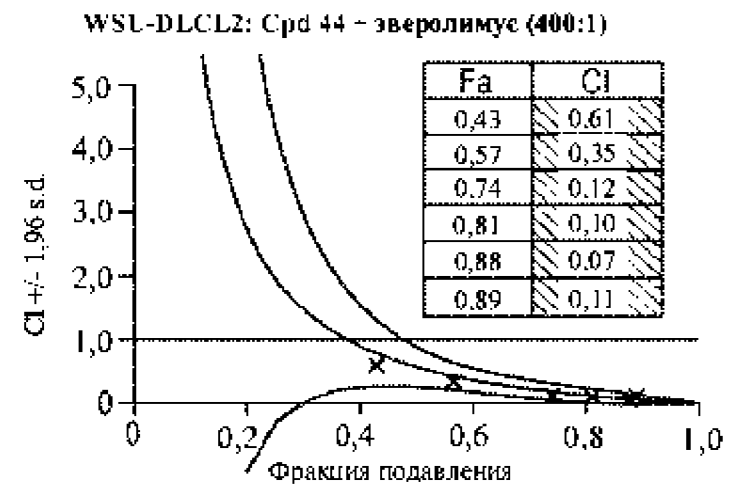
А

Срд 44 вступает в синергию с ингибитором BCL2-навитоклаксом



В

Срд 44 вступает в синергию с ингибитором mTOR-эверолимусом






		WSU-DLCL2 (GCB с мутантным EZH2)	SU-DHL-10 (GCB с мутантным EZH2)	Toledo (WT EZH2 GCB)	DOHH2 (WT EZH2 GCB)
Стандарт лечения DLBCL	Преднизолон	7x повышение эффективности	2x повышение эффективности	нет эффекта	2x повышение эффективности
	Доксорубици	синергический эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта
	Мафосфамид	аддитивный эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта
	Винкристин	аддитивный эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта
	Цисплатин	синергический эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта
	AraC	синергический эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта
Эпигенетические лекарственные средства	Вориностат	аддитивный эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта
	Панобиностат	аддитивный эффект	Не исследовано	Не исследовано	Не исследовано
	Азациадин*	аддитивный эффект	Не исследовано	Не исследовано	Не исследовано
Другие терапевтические средства	Эверолимус	очень сильный синергический эффект	сильный синергический эффект	нет эффекта	нет эффекта
	Дексаметазон	15x повышение эффективности	5x повышение эффективности	нет эффекта	4x повышение эффективности
	Навитоклакс	очень сильный синергический эффект	2x повышение эффективности	Не исследовано	нет эффекта
	Обатоклакс	аддитивный эффект	аддитивный эффект	нет эффекта	нет эффекта

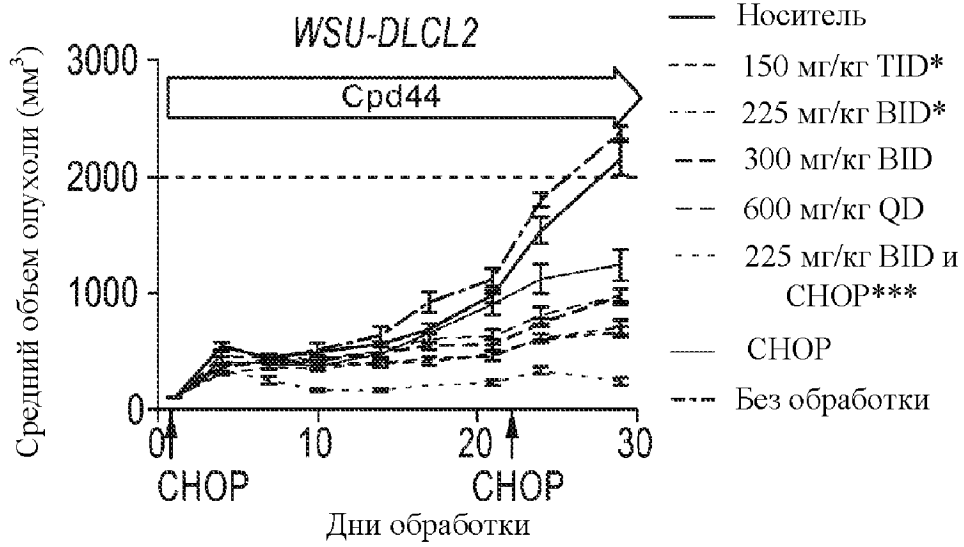
Нет эффекта = отсутствуют изменения IC<sub>50</sub> лекарственного средства после добавления Crd 44

\*Эксперименты были выполнены для «инструментального» соединения EZH2i вместо Crd 44.

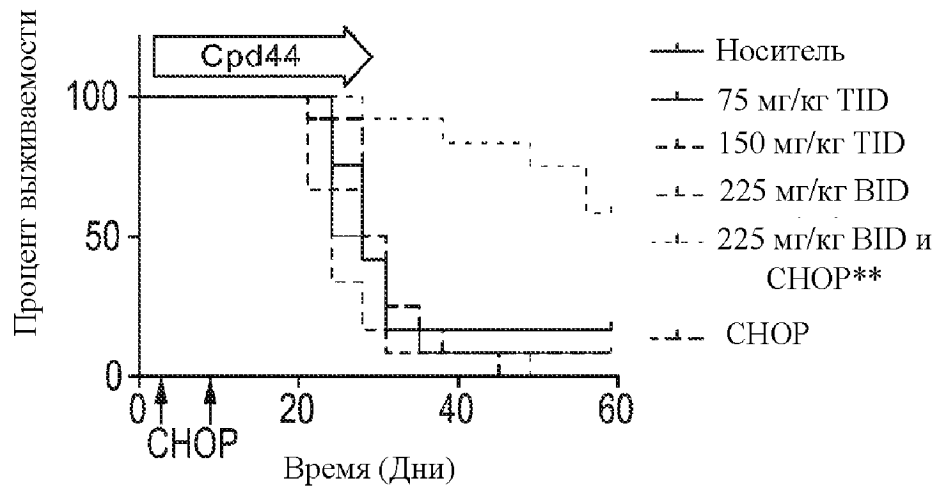
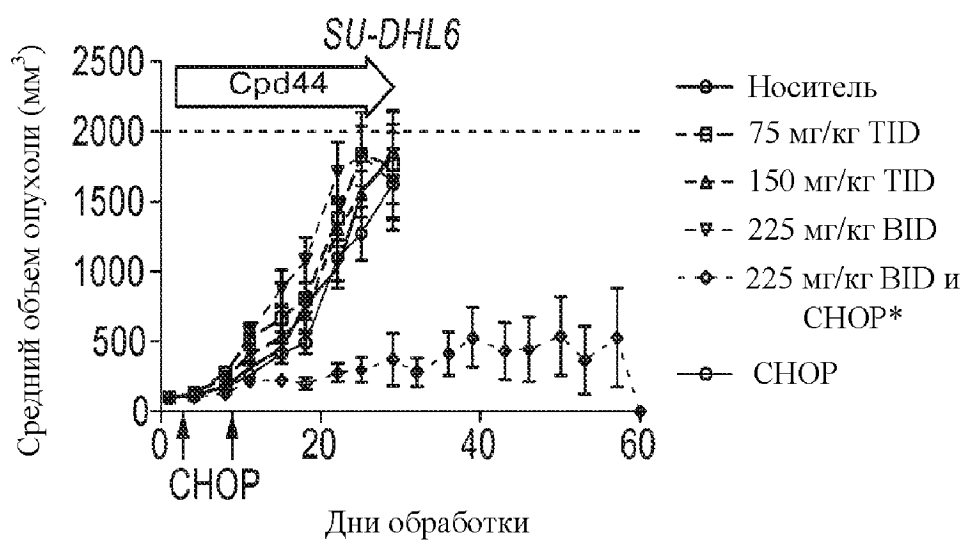
ФИГ. 6

	CI < 1 синергический эффект
	CI = 1 аддитивный эффект
	CI > 1 антагонистический эффект

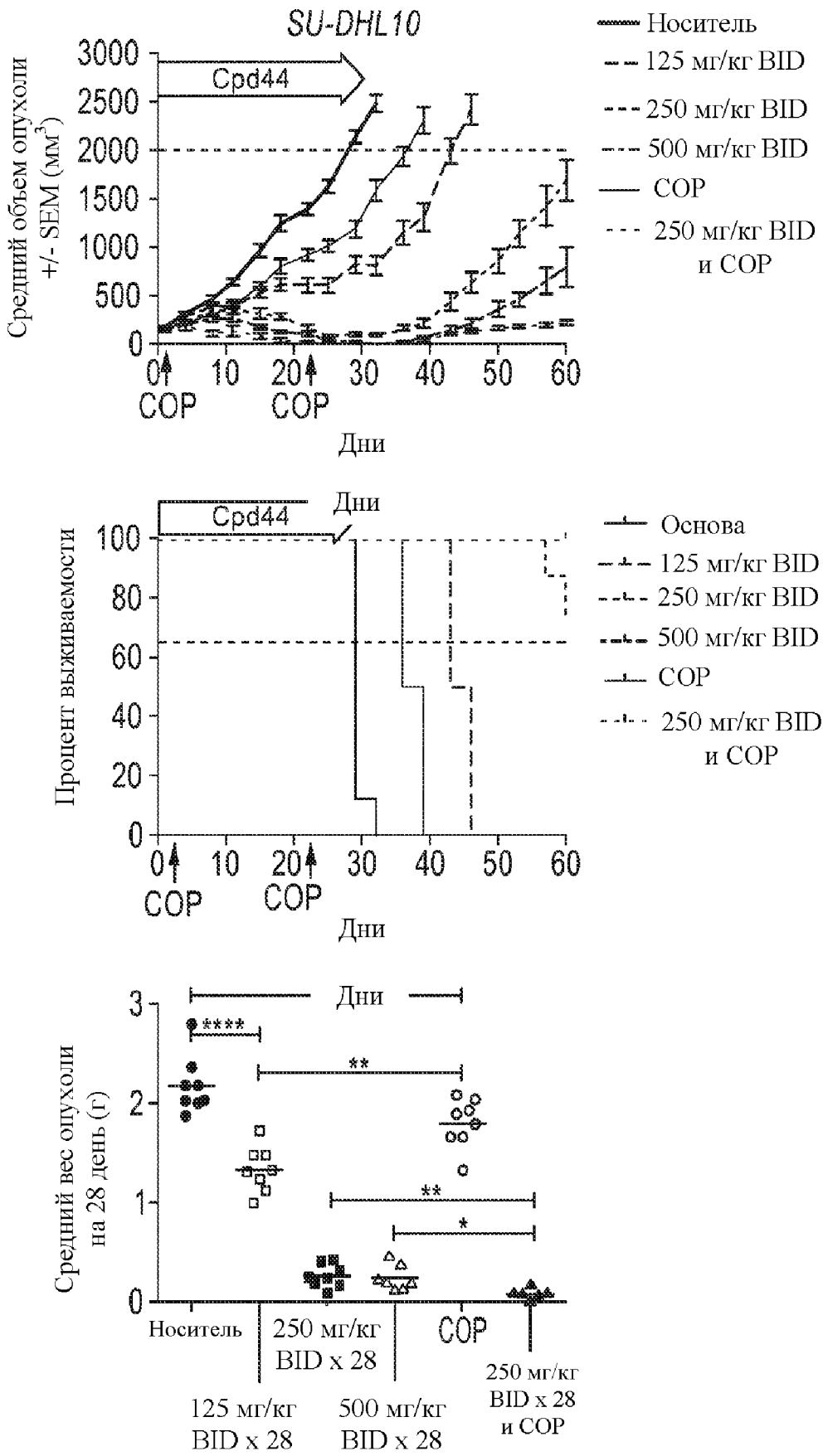
**ФИГ. 7А**



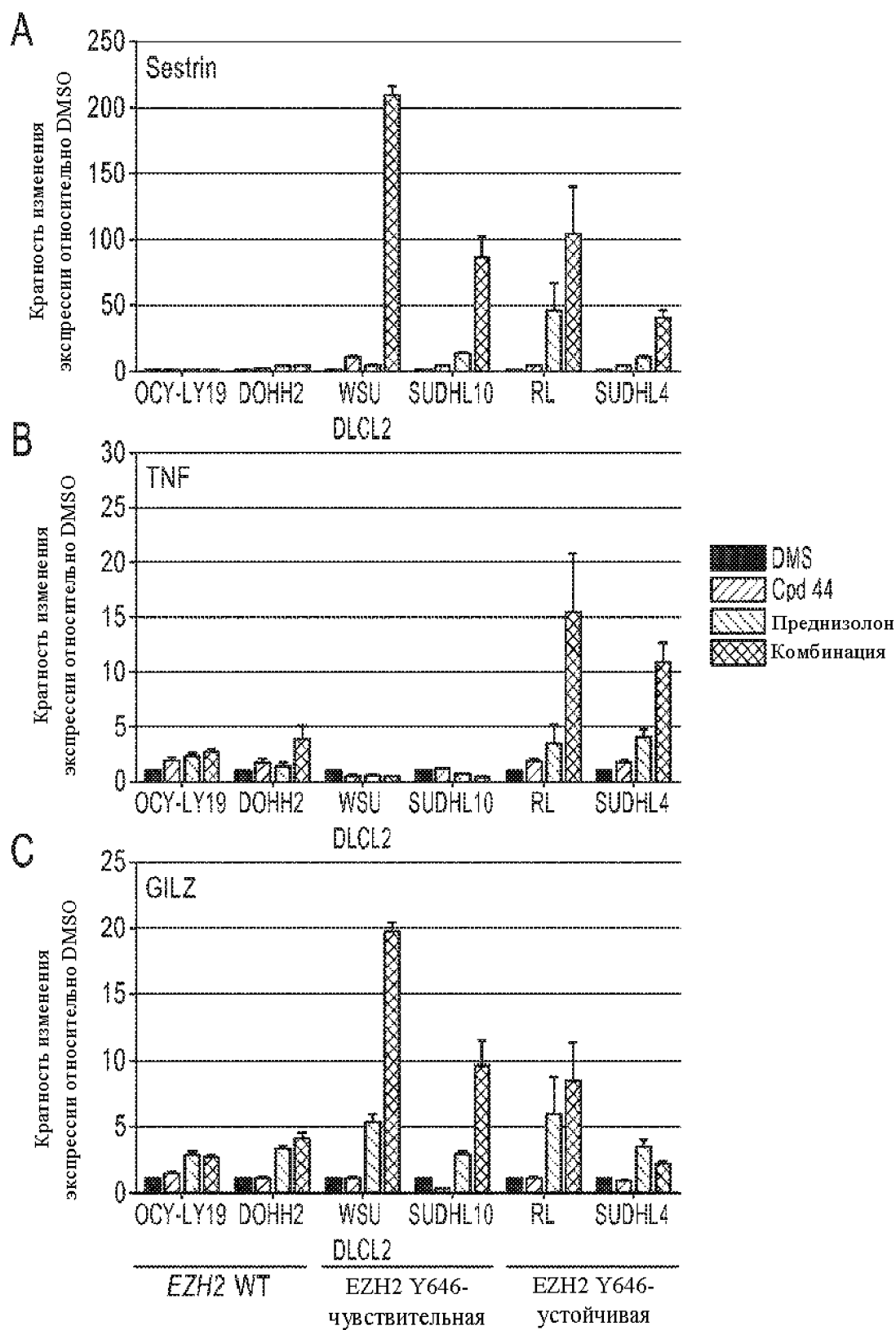
**ФИГ. 7В**



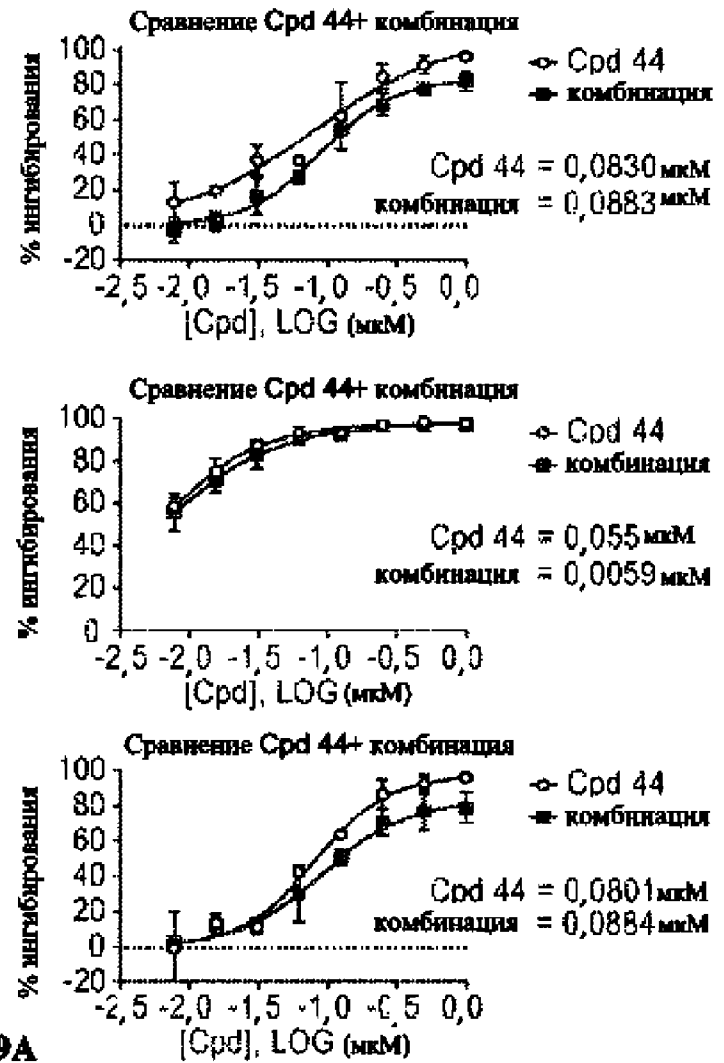
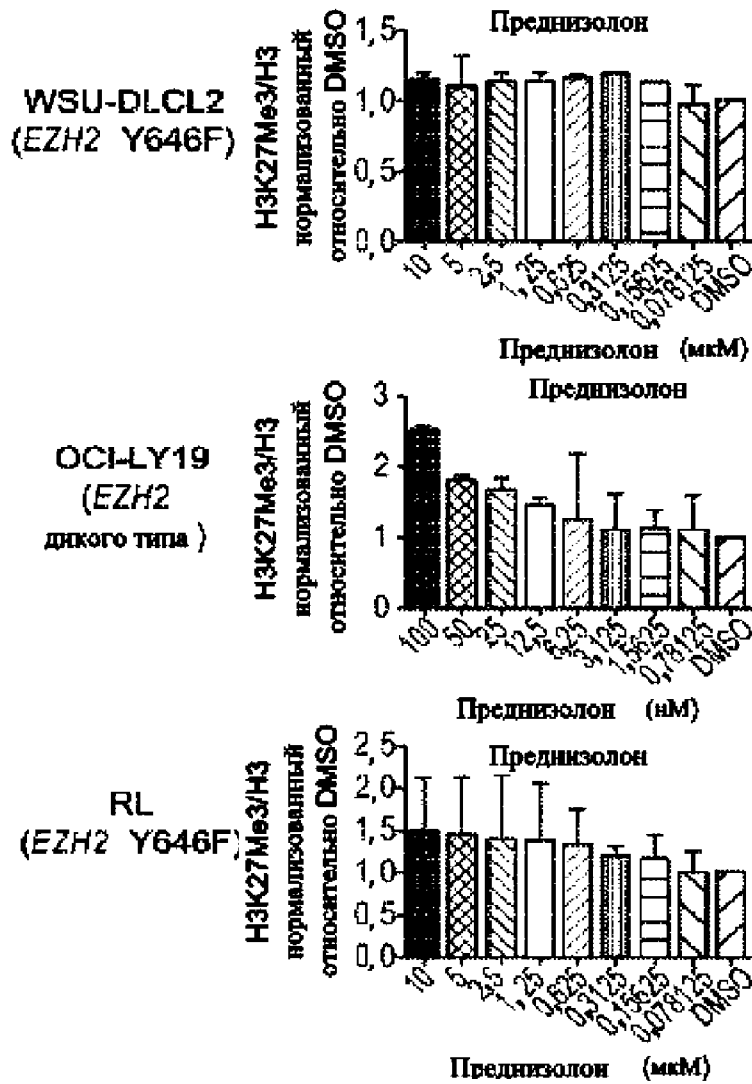
**ФИГ. 7С**



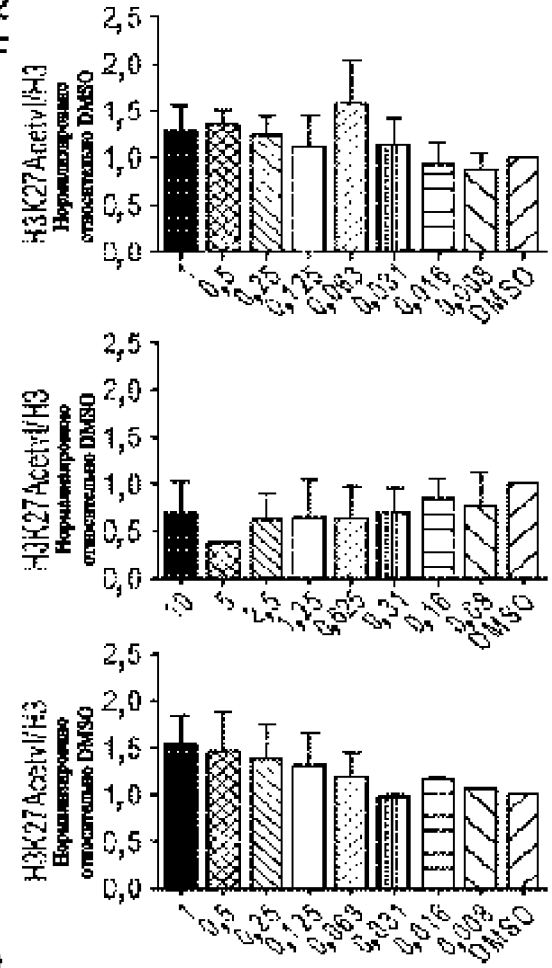
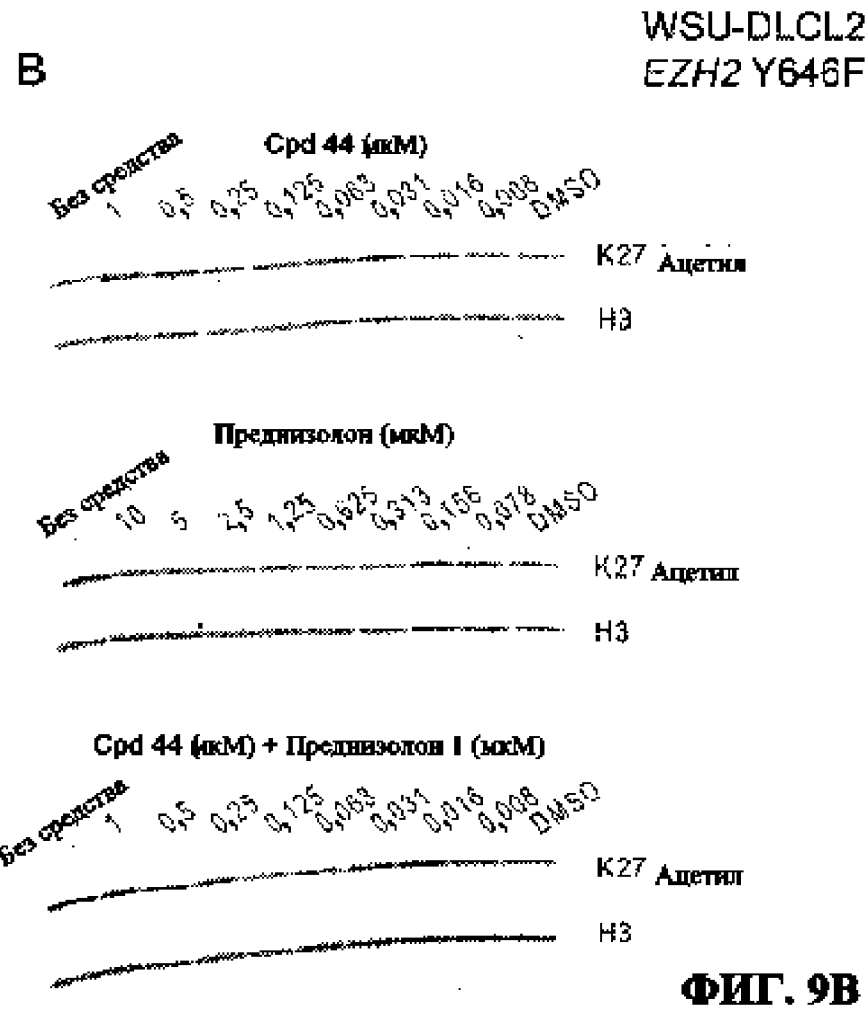
Фиг. 8



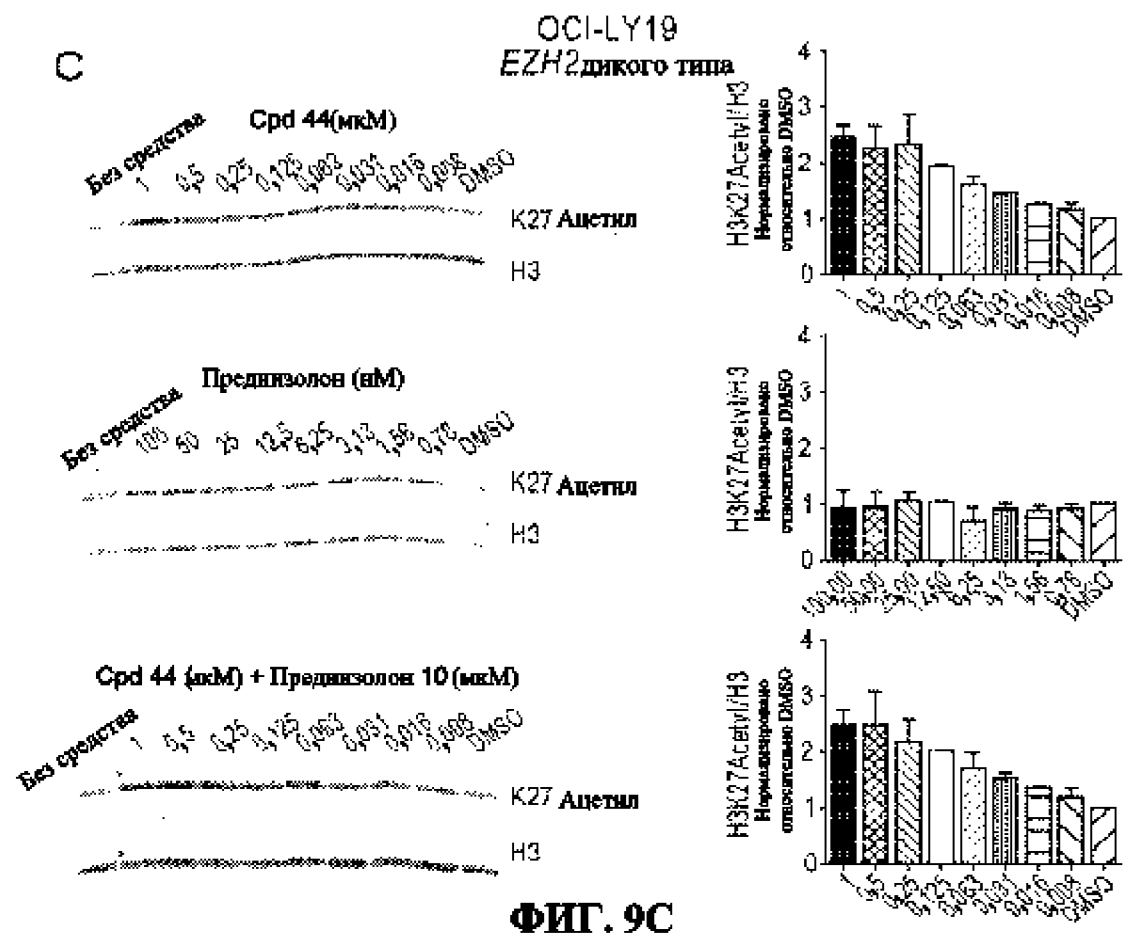




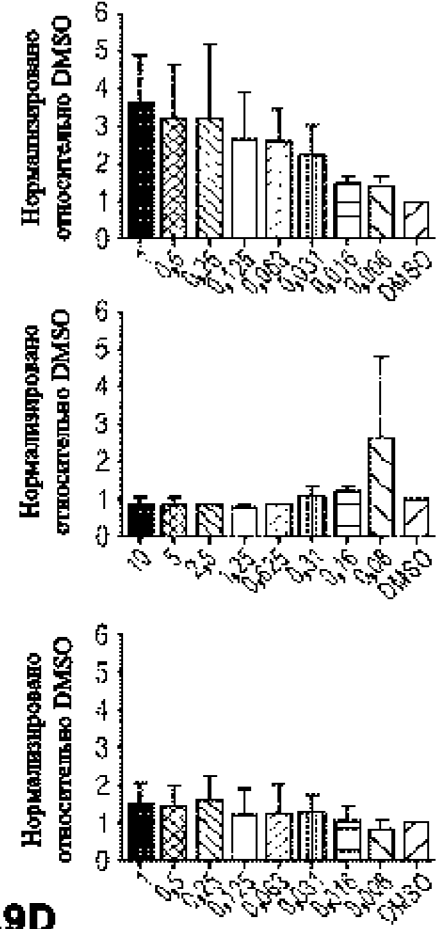
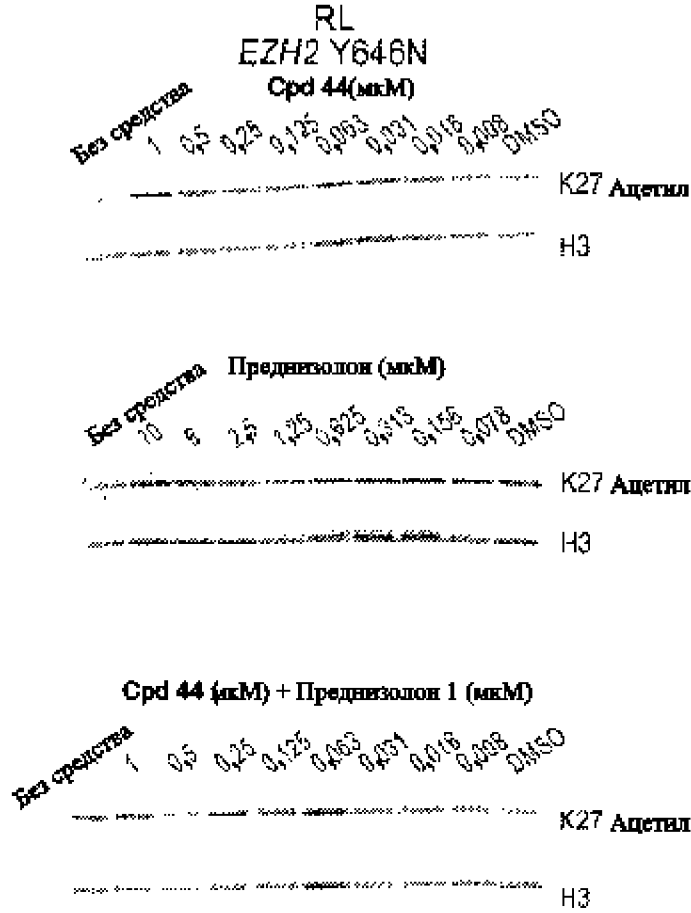
**ФИГ. 9А**



**ФИГ. 9В**

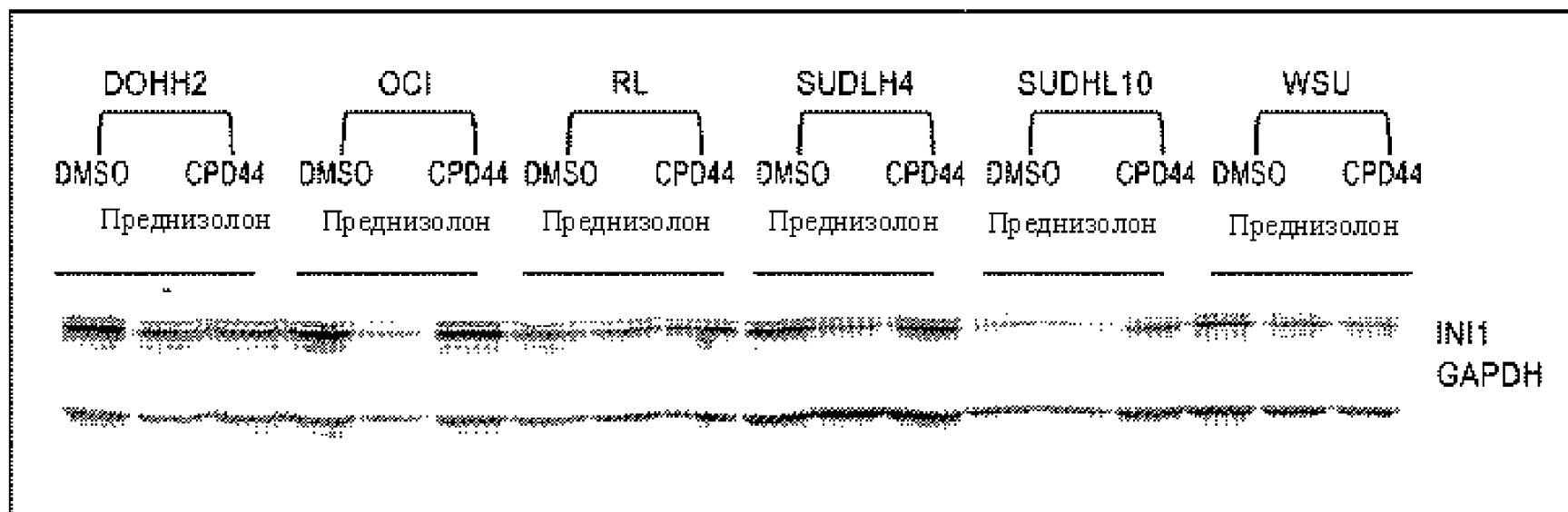


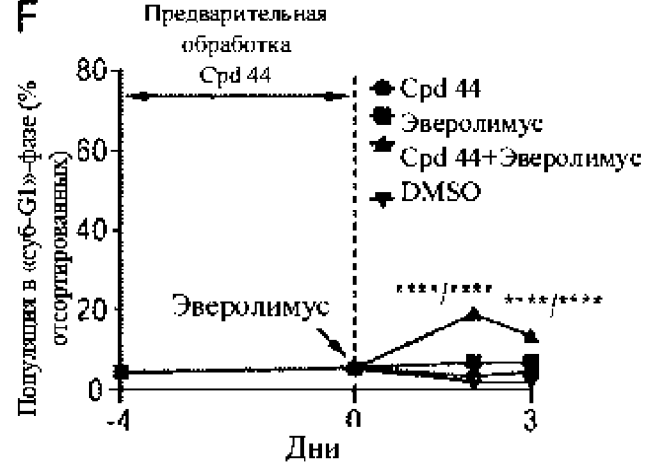
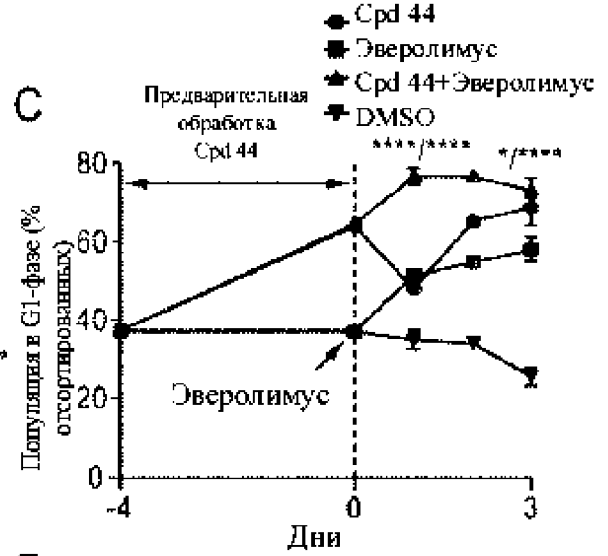
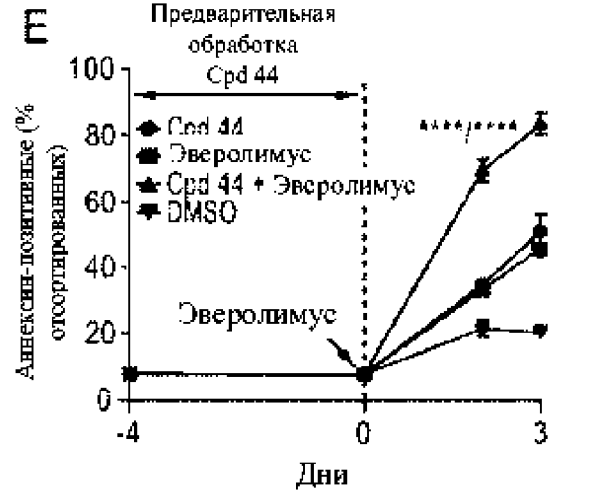
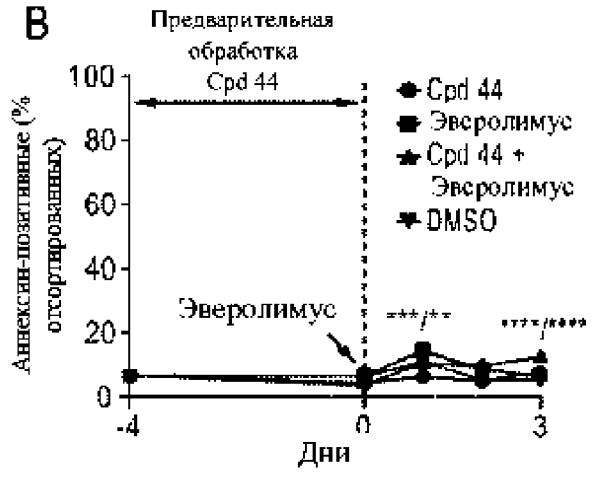
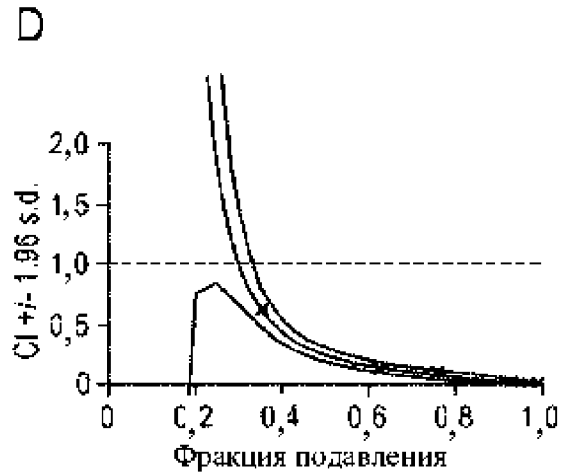
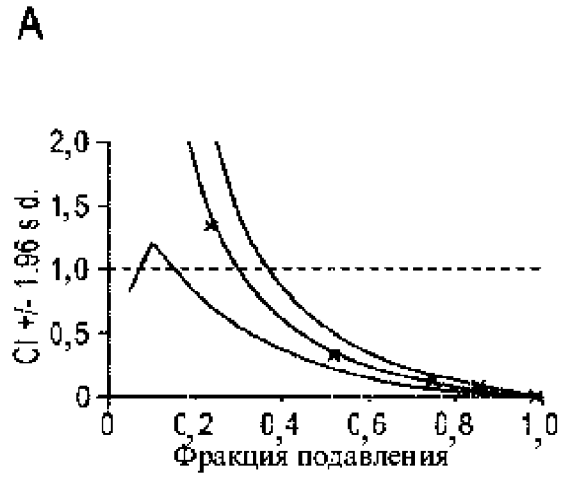
**D**



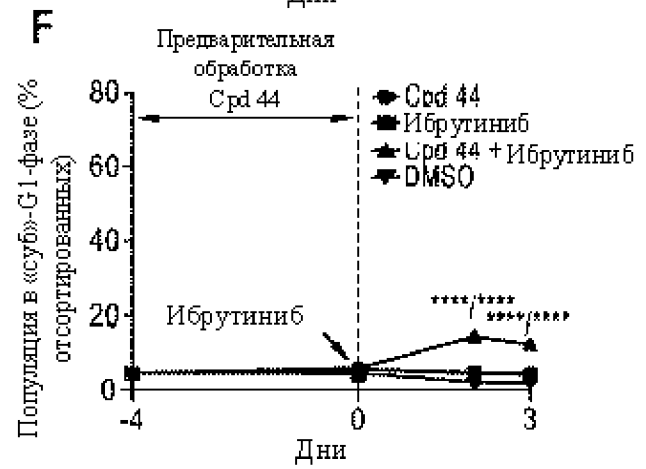
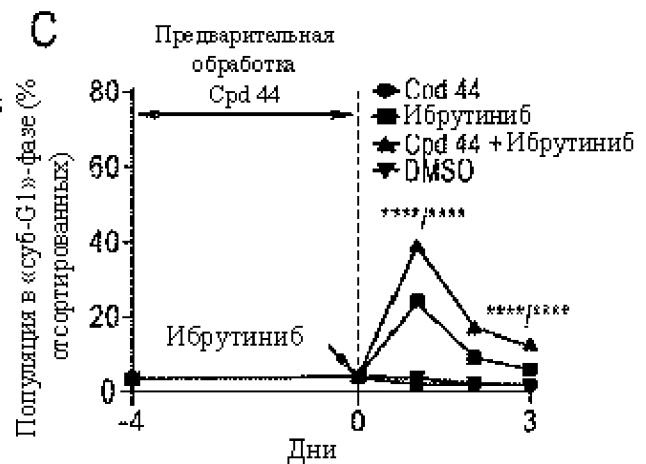
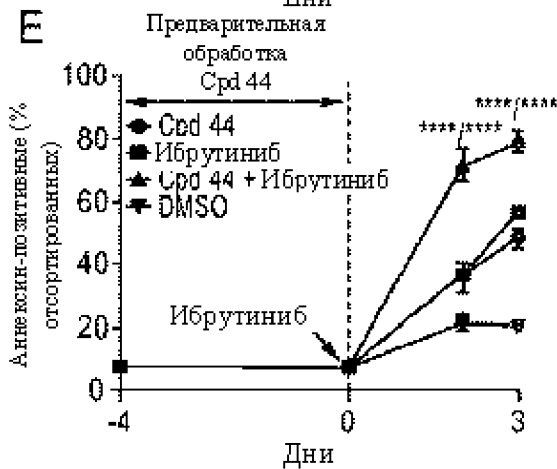
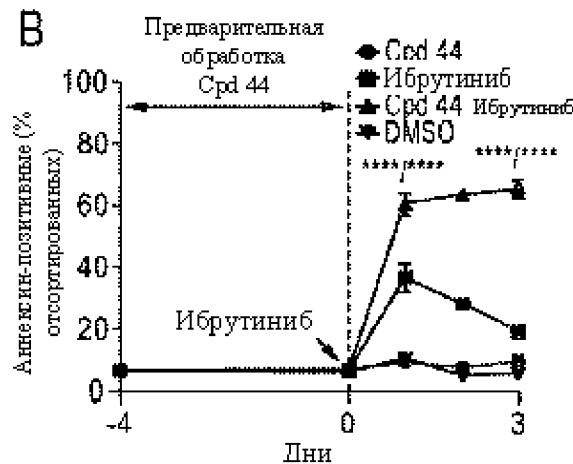
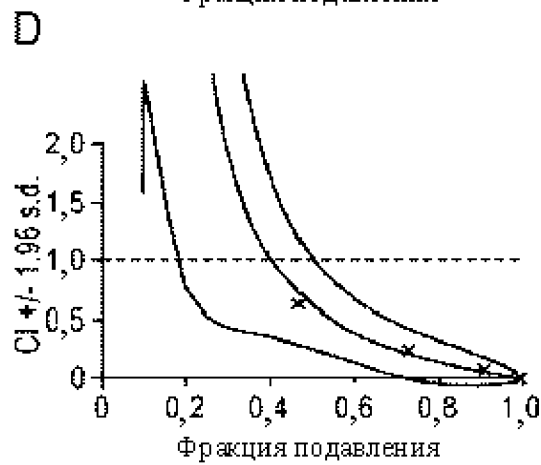
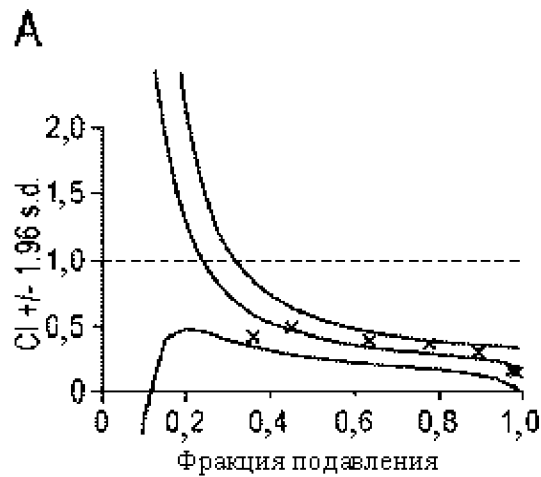
**ФИГ.9D**

ФИГ.10

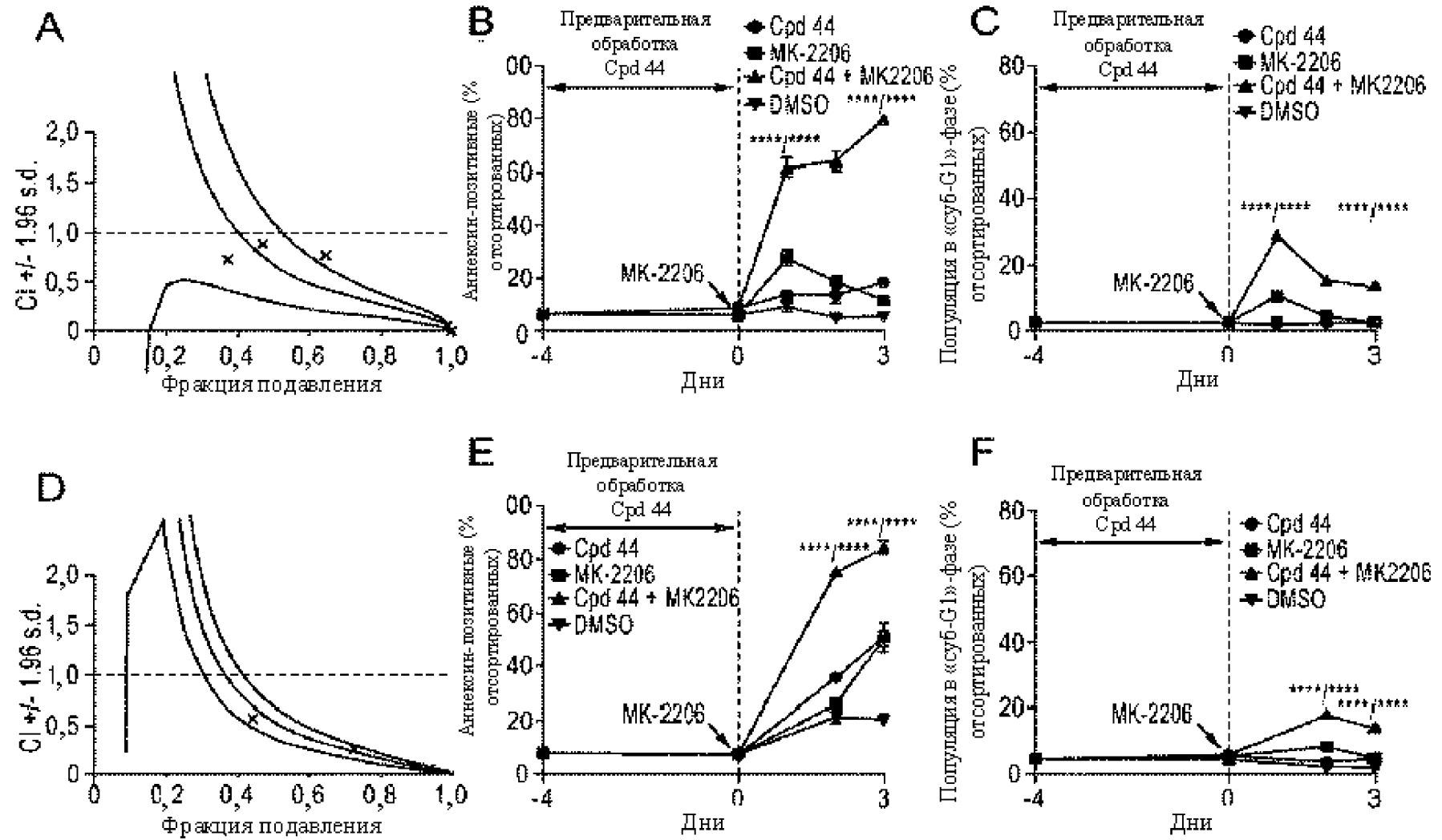




**ФИГ.11**

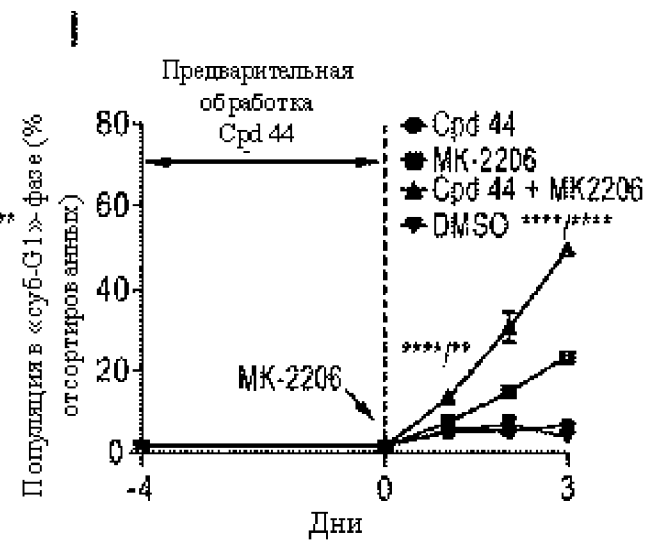
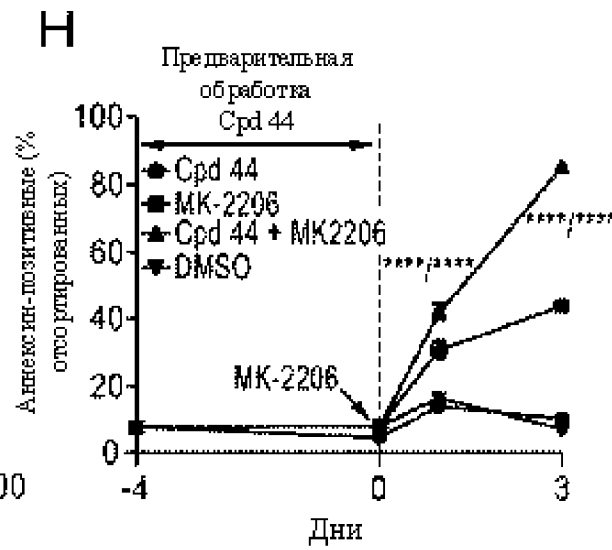
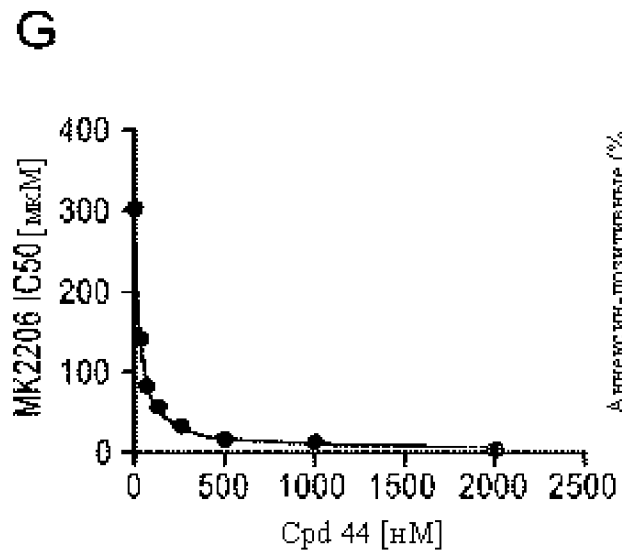


**ФИГ.12**

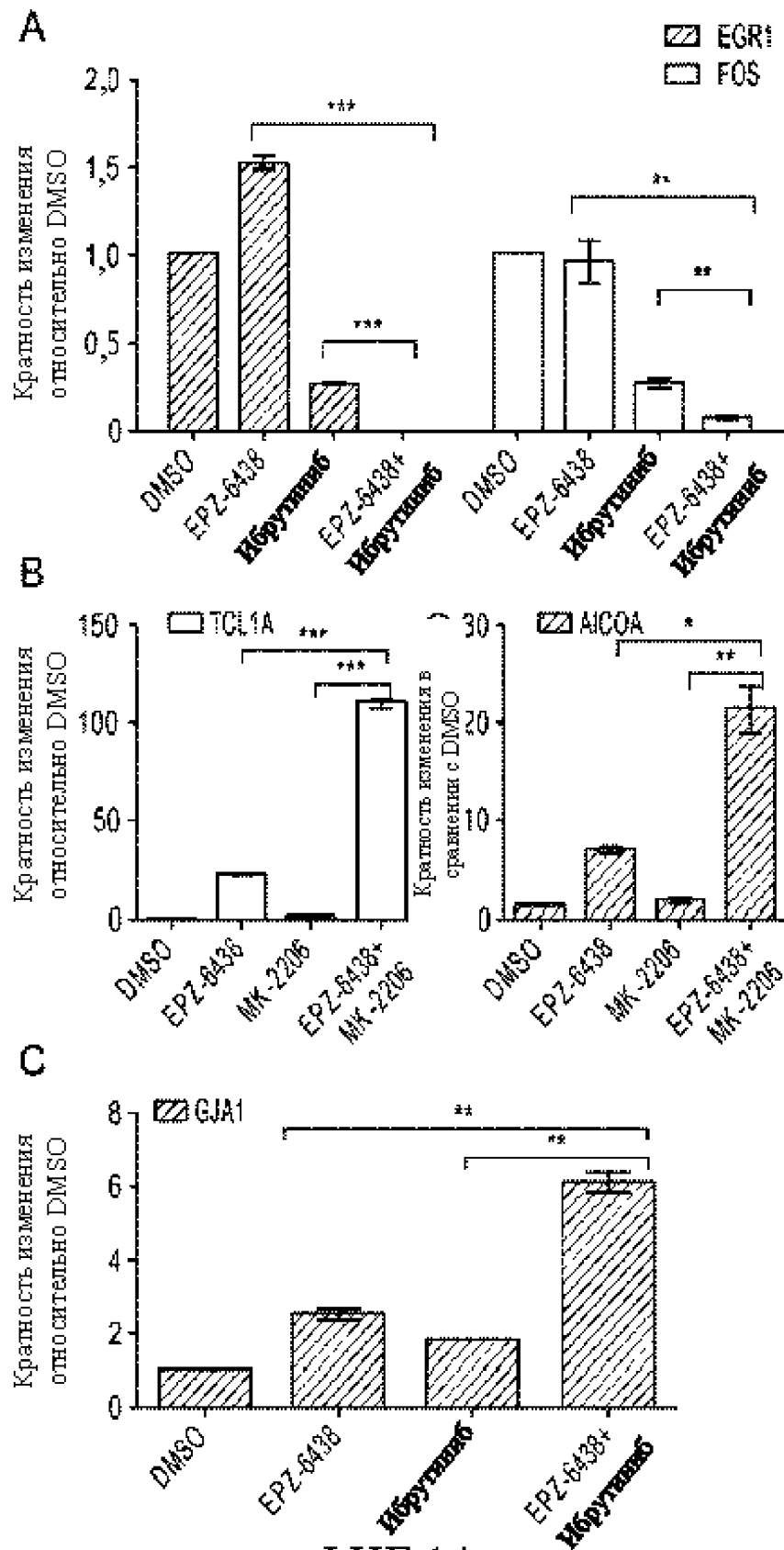


**ФИГ.13**

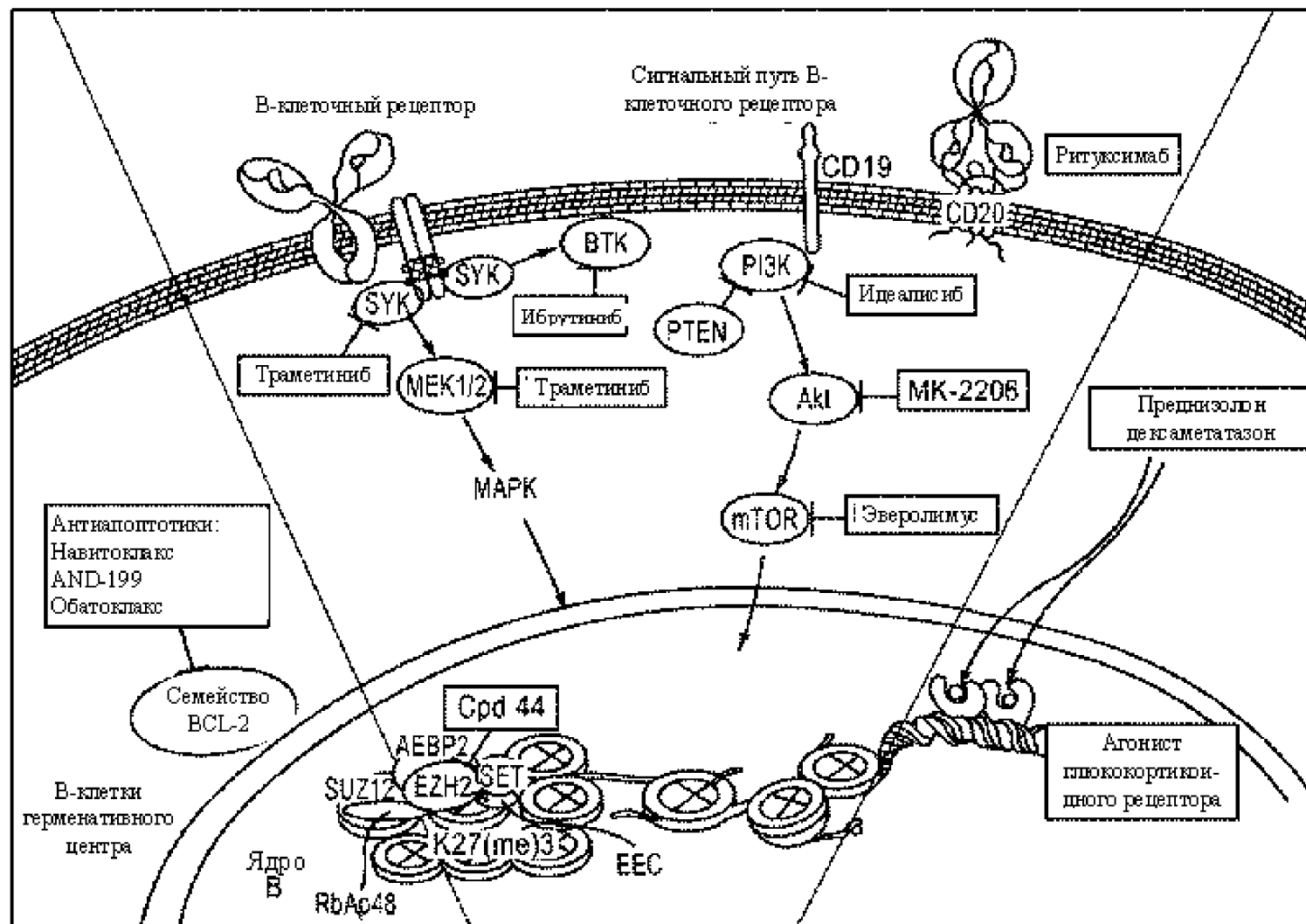




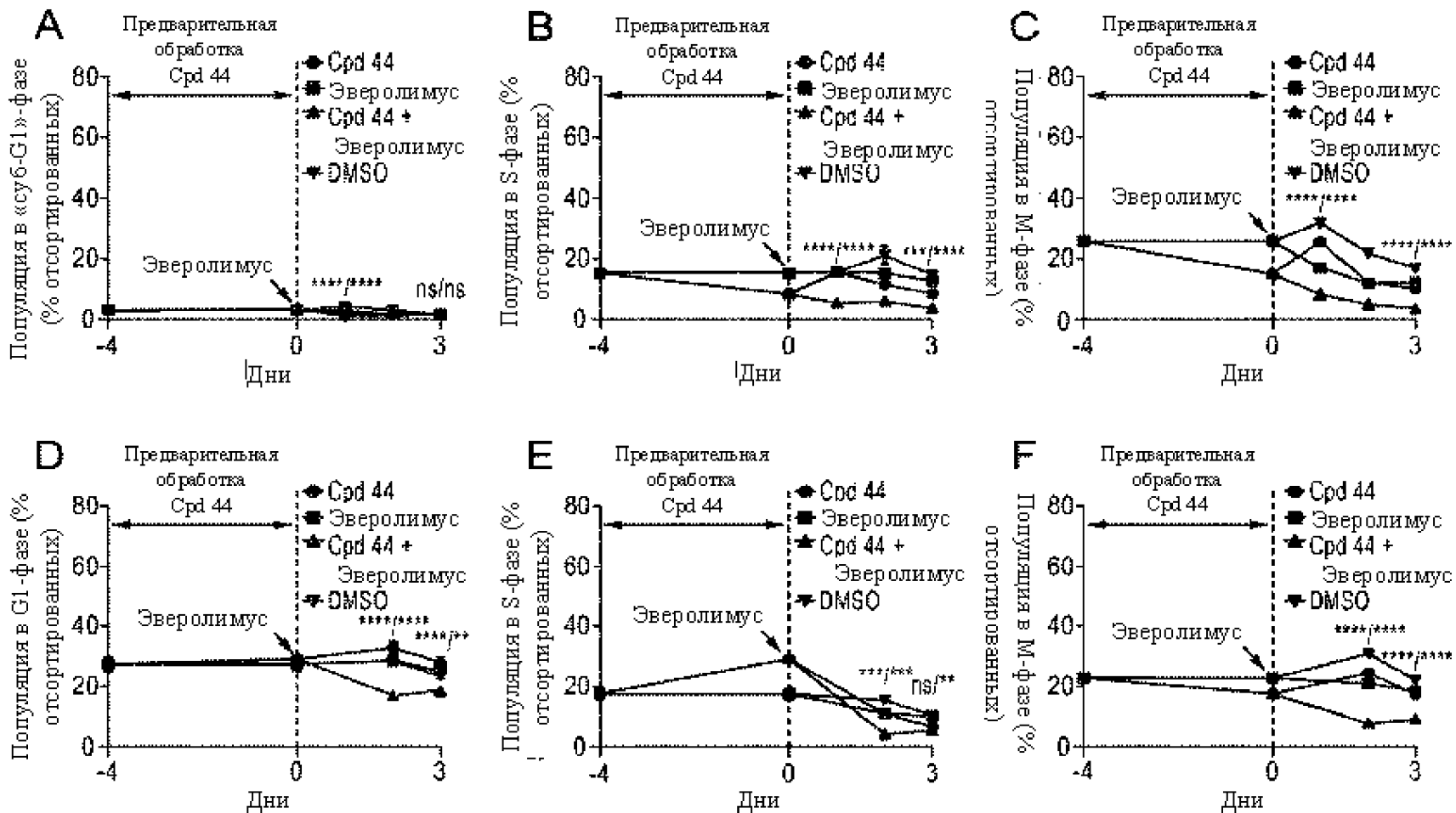
**ФИГ.13**



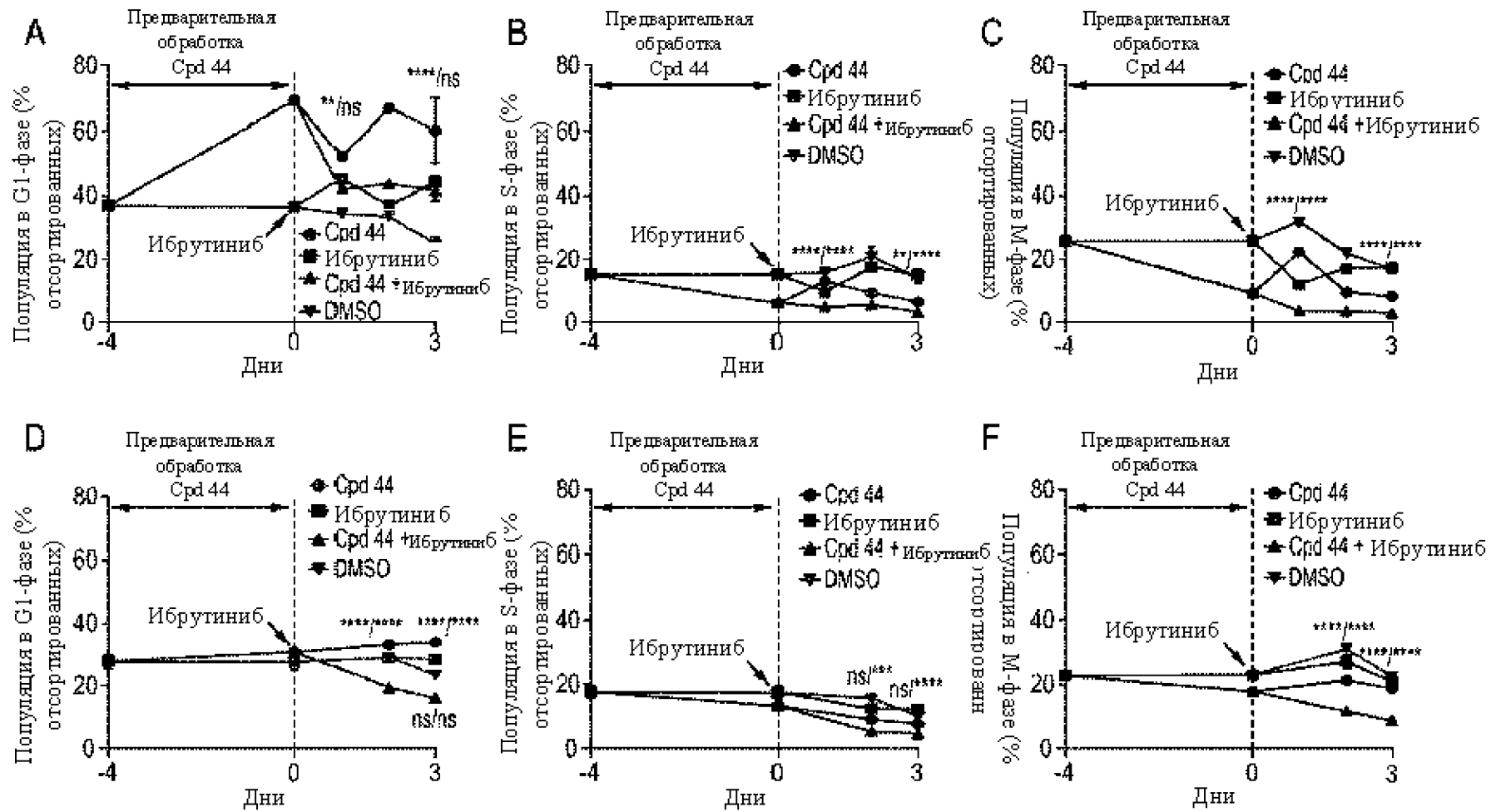
ФИГ.14



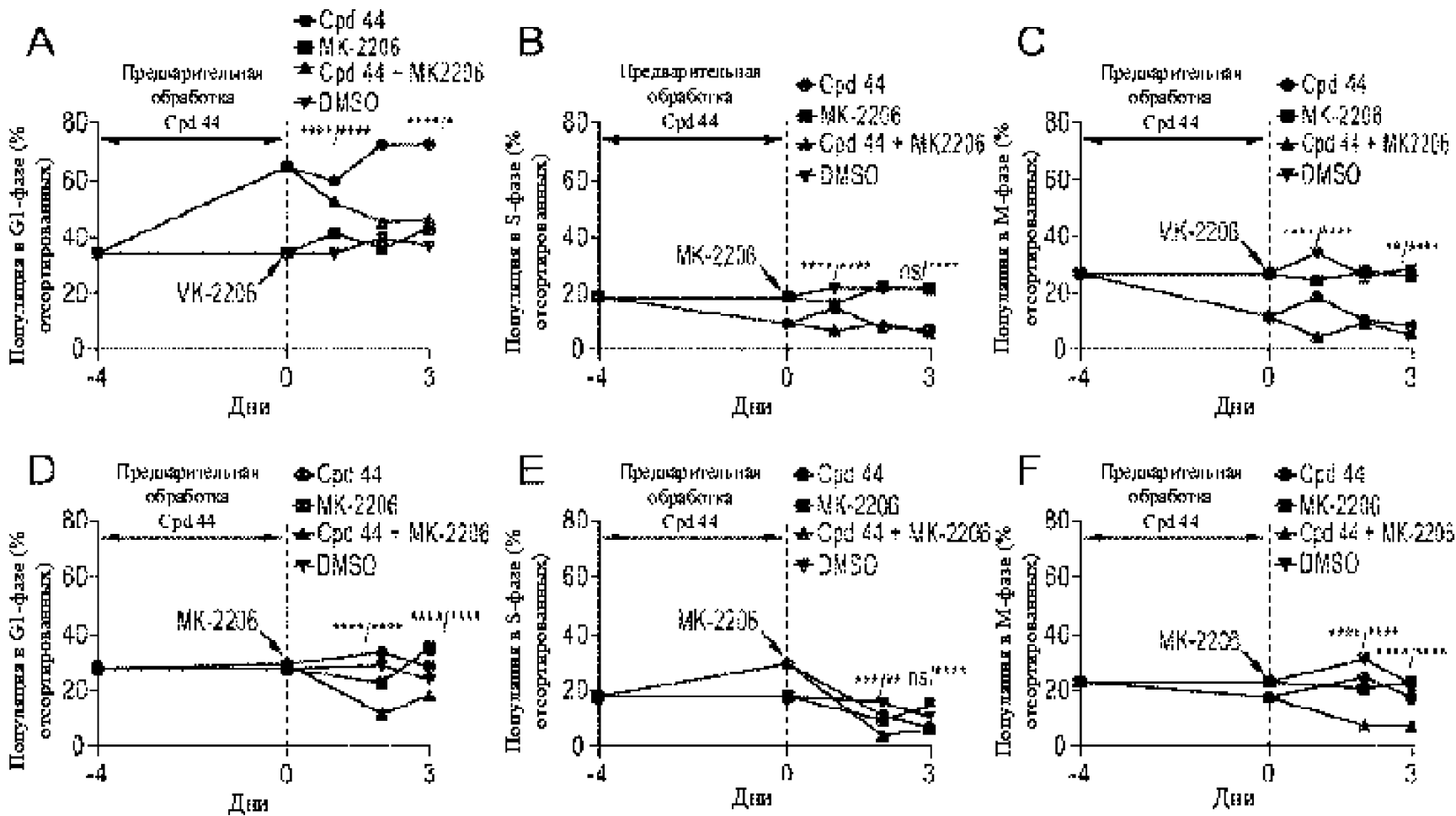
ФИГ.15



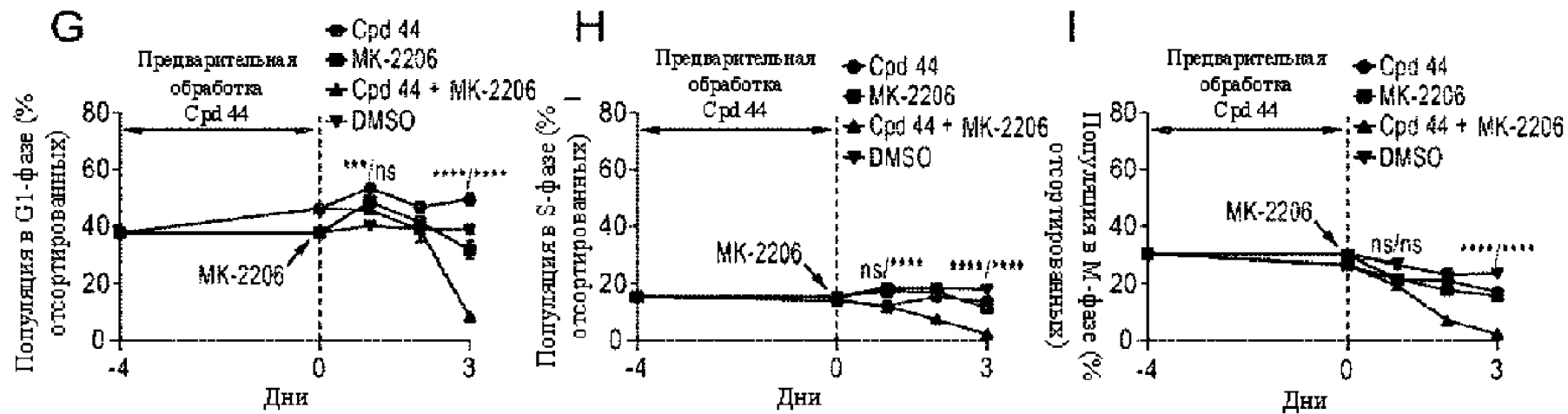
**ФИГ.16**



ФИГ.17

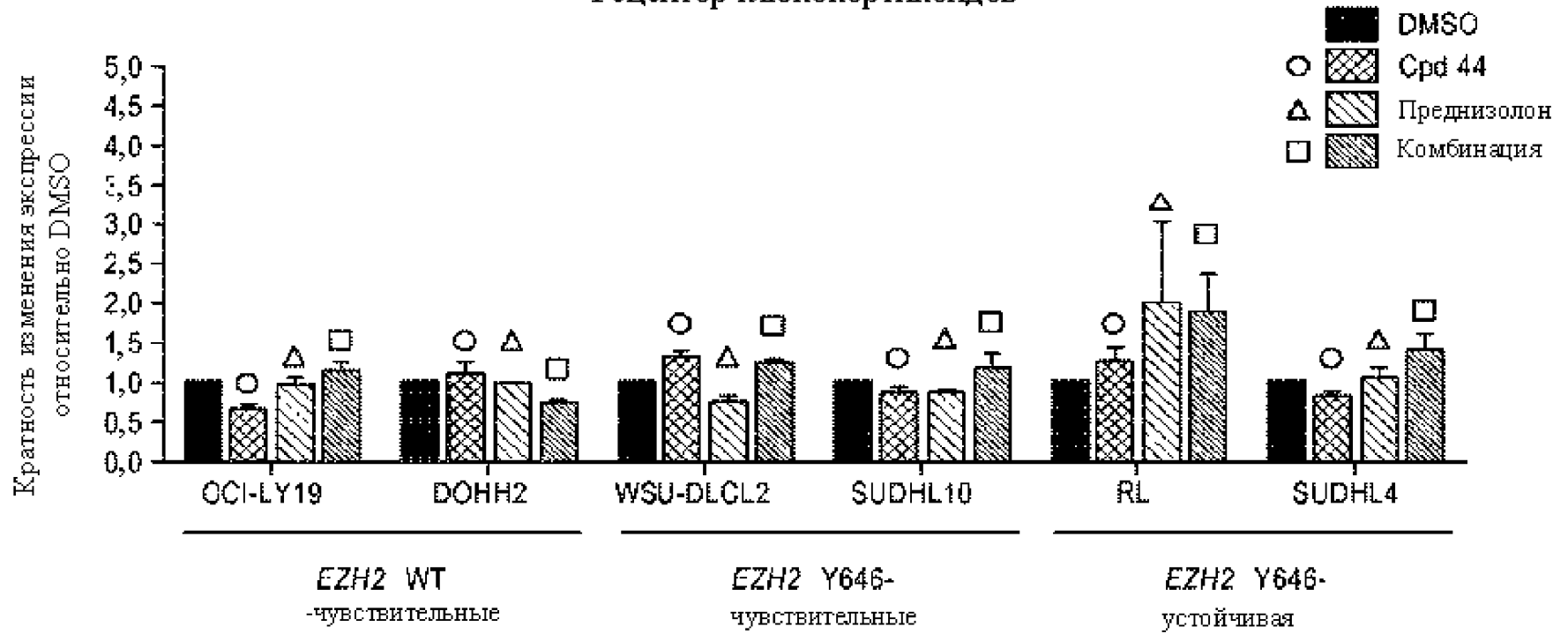


**ФИГ.18**



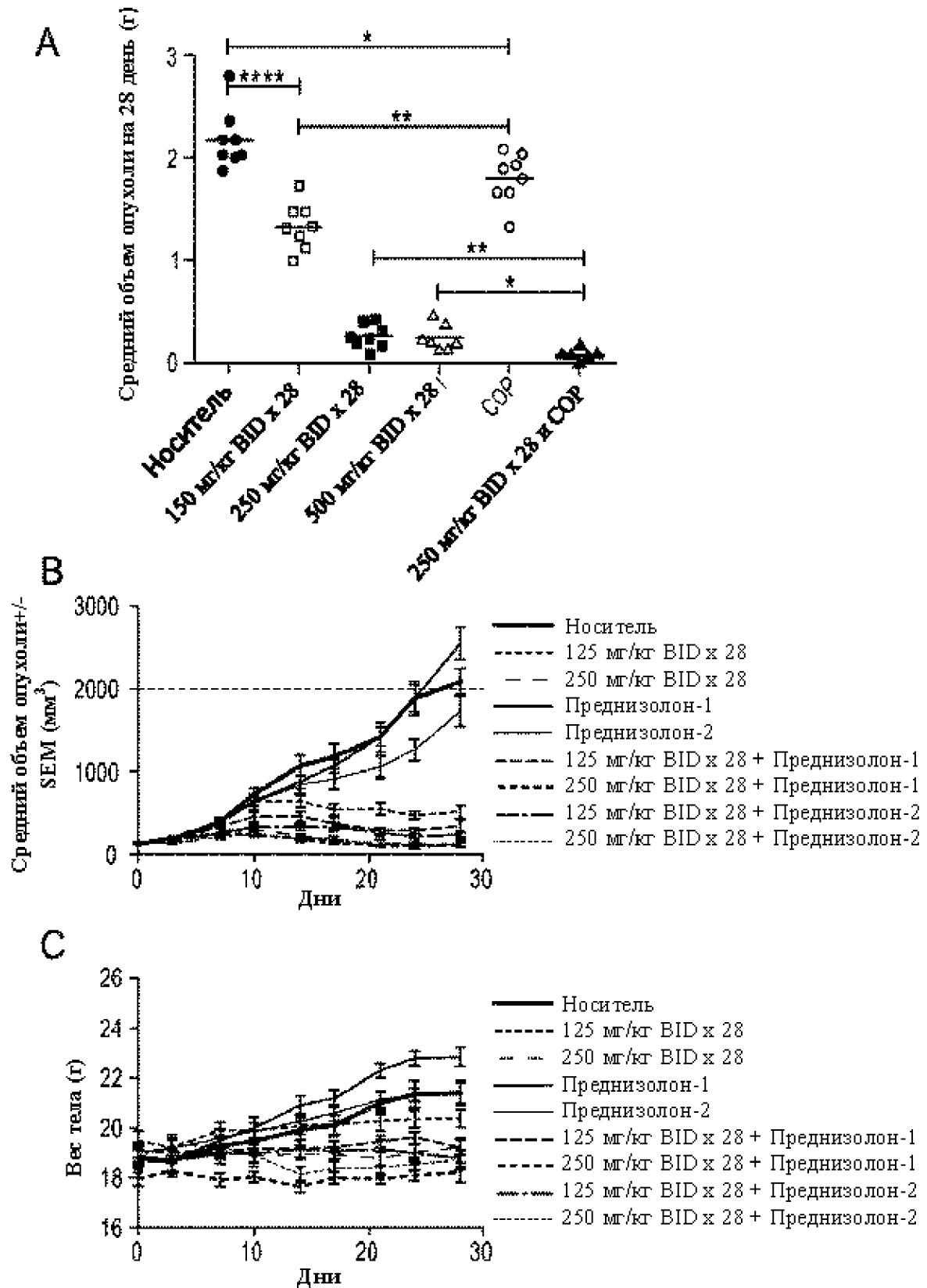
**ФИГ.18**

Рецептор глюкокортикоидов



ФИГ.19





ФИГ.20