

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037248**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.02.26**

**(21)** Номер заявки  
**201890894**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.10.05**

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

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГЕМЦИТАБИН[ФЕНИЛ-БЕНЗОКСИ-L-АЛАНИНИЛ]ФОСФАТА В КОМБИНАЦИИ С КАРБОПЛАТИНОМ**

---

**(43)** **2018.09.28**

**(86)** **PCT/GB2015/052902**

**(87)** **WO 2017/060661 2017.04.13**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НУКАНА ПиЭлСи (GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Гриффит Хью (GB)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** **BLAGDEN ET AL.:** "A first human phase I/I study of NUC-1031 in patients with advanced gynecological cancers", *J. CLIN. ONCOL. MAY 20 SUPPL*, vol. 33, no. Suppl, 2547, 2 June 2015 (2015-06-02), page 2547, XP002750958, Abstract, last 2 sentences

**MAGDALENA SLUSARCZYK ET AL.:** "Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development", *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, vol. 57, no. 4, 27 February 2014 (2014-02-27), pages 1531-1542, XP0055205033, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm401853a, abstract

**A. DU BOIS ET AL.:** "Phase III Trial of Carboplatin Plus Paclitaxel With or Without Gemcitabine in First-Line Treatment of Epithelial Ovarian Cancer", *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, vol. 28, no. 27, 23 August 2010 (2010-08-23), pages 4162-4169, XP0055228805, US, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2009.27.4696, abstract

---

**(57)** Изобретение относится к применению гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата (NUC-1031) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака яичников в комбинации с карбоплатином, где доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, составляет от 250 до 1250 мг/м<sup>2</sup>, а доза карбоплатина, вводимого в каждом случае введения, выбрана для получения AUC от 2 до 5,5 мг/мл·мин. Изобретение также относится к способу лечения рака яичников путем введения указанной выше комбинации.

---

**B1**

**037248**

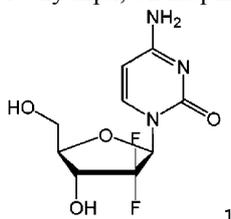
**037248 B1**

Изобретение относится к комбинации гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата (химическое название: 2'-дезоксид-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил(бензокси-L-аланинил)фосфат] (NUC-1031) и противоракового средства на основе платины, такого как карбоплатин.

#### Уровень техники

NUC-1031.

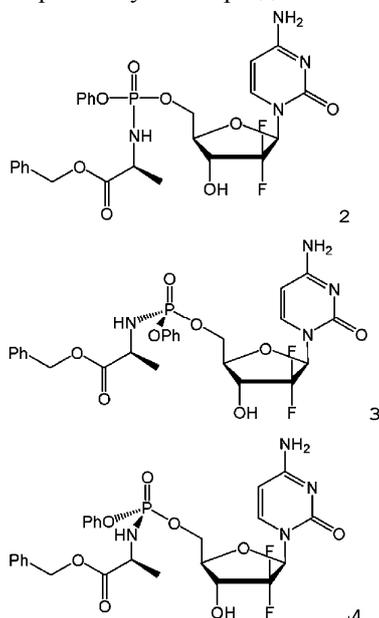
Гемцитабин (1; продаваемый как Гемзар®) является эффективным нуклеозидным аналогом, который в настоящее время одобрен для лечения рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников и поджелудочной железы, и широко используется для лечения ряда других злокачественных новообразований, включая рак мочевого пузыря, билиарный рак, колоректальный рак и лимфому:



Клиническое использование гемцитабина ограничено рядом присущих организму и приобретенных механизмов резистентности. На клеточном уровне резистентность зависит от трех параметров: (i) ингибирования дезоцитидинкиназы, необходимой для активации в фосфорилированную молекулу; (ii) пониженной экспрессии нуклеозидных переносчиков, в частности hENT1, необходимых для захвата раковыми клетками; и (iii) стимуляции каталитических ферментов, особенно цитидиндезаминазы, которая разрушает гемцитабин.

В WO 2005/012327 описана серия нуклеотидных пролекарств гемцитабина и связанных с ними нуклеозидных лекарственных молекул. Среди них гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат (NUC-1031; 2) выделен как особенно эффективное соединение. Эти пролекарства, по-видимому, минуют многие присущие и приобретенные механизмы резистентности, которые ограничивают применимость гемцитабина ("Application of ProTide Technology to Gemcitabine: A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC-1031) in Clinical Development"; Slusarczyk et al.; J. Med. Chem.; 2014, 57, 1531-1542).

NUC-1031 2 обычно получают в виде смеси двух диастереоизомеров, эимерных по фосфатному центру (S-эпимер 3 и R-эпимер 4), которые могут быть разделены и введены в виде отдельного эимера:



ProGem1 был первым исследованием на людях (FTIH), фаза I, без контроля плацебо двухстадийное исследование безопасности, переносимости, клинической эффективности, фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) NUC-1031, который вводили двумя параллельными графиками введения пациентам с солидными злокачественными новообразованиями на поздних стадиях (EudraCT Number: 2011-005232-26). На стадии включения в исследование у индивидов были следующие типы опухолей: колоректальный рак (3 индивида), неизвестный первичный рак (3), рак яичников (4), рак молочной железы (2), рак поджелудочной железы (3), холангиокарцинома (2), рак матки или эндометрия (3), рак шейки матки (1), рак легкого (2), мезотелиома (3) и рак щитовидной железы (1). Исследование подтвердило противоопухолевую активность NUC-1031 у пациентов с прогрессирующими видами рака на поздних стадиях, которые получили все варианты стандартной терапии, многие из которых были резистентны или невосприимчивы

к ранее проводимой терапии нуклеозидными аналогами, включая гемцитабин. Особо следует отметить, что фармакокинетические данные показали, что NUC-1031 в качестве самостоятельного средства дает  $C_{\max}$  внутриклеточных уровней активной трифосфатной группы (dFdCTP) в 10 раз выше, чем гемцитабин в качестве самостоятельного средства в эквивалентной дозе. Кроме того, анализ показал, что NUC-1031 высвобождает уровни токсического метаболита, обычно связанного с гемцитабином, которые составляют меньше половины.

#### Рак яичников.

Рак яичников является шестым наиболее часто диагностируемым раком у женщин во всем мире и ежегодно диагностируется 204000 новых случаев. Отмечается высокий уровень смертности с 5-летней выживаемостью в 45% случаев прежде всего из-за того, что у многих женщин наблюдается поздняя стадия заболевания, а также высокая частота рецидивов заболевания и развитие резистентности к платине. Первоначальной терапией рака яичников на поздних стадиях является комбинация оптимальной циторедуктирующей хирургической операции и системного воздействия химиотерапевтическим режимом лечения препаратами платины и таксана. Несмотря на то, что полный ответ после лечения наблюдается у 70%, у большинства из них в течение последующих 2 лет возникает рецидив заболевания.

Терапия рецидивирующего заболевания регулируется временем между первичной терапией и рецидивом. Этот интервал определяют как бесплатиновый интервал (БПИ): (1) пациентов с прогрессированием заболевания в процессе проведения терапии на основе платины или в течение 4 недель после последней дозы платины определяют как страдающие заболеванием, трудно поддающимся лечению платиной; (2) пациенты с БПИ менее 1 месяца и менее 6 месяцев, страдают заболеванием, резистентным к платине; (3) у пациентов, у которых БПИ равно 6-12 месяцам, имеется частичная резистентность к платине; (4) у пациентов, у которых БПИ менее чем 12 месяцев, имеется платиночувствительный рецидив. Согласно рекомендациям NICE пациентов с резистентностью к платине или с трудно поддающимся заболеванием следует лечить топотеканом, липосомальным доксорубицином, еженедельно паклитакселом или включать в клиническое испытание. У пациентов с частичной резистентностью к платине и с рецидивом, следует проводить терапию, основанную на платине, такую как терапия карбоплатином с гемцитабином, карбоплатином с липосомальным доксорубицином, или включать в клиническое испытание. У пациентов с заболеванием, резистентным к платине, следует снова провести терапию карбоплатином либо в виде монотерапии, либо в комбинации с паклитакселом. К сожалению, у пациентов с резистентностью к платине и рецидивом средняя выживаемость (35-61 недель) значительно меньше, чем у пациентов с заболеванием, чувствительным к платине (>104 недели), что указывает на то, что ответ на платину является основным фактором, определяющим выживаемость.

#### Резистентность к химиотерапии при раке яичников.

Почти неизбежным результатом повторяющихся курсов химиотерапии на основе платины является развитие резистентности к платине. Это происходит посредством ряда механизмов, таких как стимуляция репарации повреждений ДНК и антиапоптозных белков, снижение переносчиков меди и увеличение выхода лекарственного средства из раковой клетки. Основной причиной комбинированной химиотерапии на основе платины (например, карбоплатина) с другим химиотерапевтическим средством, таким как гемцитабин или липосомальный доксорубин, является преодоление резистентности и улучшение чувствительности к платине. Безусловно, ответ на один карбоплатин при частичной резистентности к платине с рецидивом уступает по сравнению со случаем, когда назначают карбоплатин в комбинации с гемцитабином или липосомальным доксорубицином. Хотя ответ на комбинированную терапию превосходит монотерапию платиной, общий прогноз для таких пациентов очень низок, и для этой группы необходимы новые подходы лечения.

#### Гемцитабин при раке яичников.

Гемцитабин в сочетании с платиной (например, карбоплатином) эффективен при рецидивирующем раке яичников даже после ранее проводимого лечения платиной благодаря способности гемцитабина к регрессии резистентности, связанной с улучшенной репарацией ДНК. В исследовании AGO-OVAR 356 пациентам с рецидивом рака яичников, чувствительным к платине, назначали либо только карбоплатин AUC5, либо карбоплатин AUC4 (день 1) плюс гемцитабин 1000 мг/м<sup>2</sup> на 1- и 8-й день каждые 3 недели. После среднего периода наблюдения 17 месяцев регистрировали среднюю PFS, равную 8,6 месяца (95% CI, 7,9-9,7 месяца) для гемцитабина плюс карбоплатин и равную 5,8 месяца (95% CI, 5,2-7,1 месяца) для только карбоплатина (HR 0,72 (95% CI, 0,58-0,90, P=0,0031)). Частота ответа составила 47,2% (95% CI, 39,9%-54,5%) для гемцитабина плюс карбоплатин и 30,9% (95% CI, 24,1%-37,7%) только для карбоплатина (P=0,0016). Ввиду улучшения реакции и выживания гемцитабин обычно назначают вместе с карбоплатином при рецидивирующей чувствительной к платине форме.

Комбинацию карбоплатина AUC4 (день 1) и гемцитабина 1000 мг/м<sup>2</sup> в (1- и 8-й дни) каждые 3 недели испытывали в контрольной группе исследования OCEANS, рандомизированное исследование у пациентов с чувствительным к платине раком яичников. 242 пациента получали эту комбинацию и продемонстрировали частоту объективного ответа - 57,4%, частичный ответ - 48,3% и продолжительность ответа 7,4 месяца. У женщин с резистентным к платине рецидивом гемцитабин, назначенный вместе с карбоплатином, показал в одном исследовании общую частоту ответа - 47%. Однако, учитывая вероятную рези-

стентность к карбоплатину и относительно низкий клеточный захват гемцитабина у этих пациентов, обычно предпочтительны другие неплатиновые режимы по сравнению с карбоплатином и гемцитабином.

Целью настоящего изобретения является комбинированная терапия рака. Целью настоящего изобретения является терапия, которая более эффективна, чем существующие способы лечения.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения удовлетворяют некоторым или всем вышеуказанным целям.

#### **Краткое описание изобретения**

В соответствии с настоящим изобретением предложено применение гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфата (NUC-1031) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака яичников в комбинации с карбоплатином, где доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, составляет от 250 до 1250 мг/м<sup>2</sup>, а доза карбоплатина, вводимого в каждом случае введения, выбрана для получения AUC от 2 до 5,5 мг/мл·мин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфат находится в форме свободного основания.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рак рецидивирует.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рак является трудно поддающимся лечению, резистентным или частично резистентным к карбоплатину.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рак чувствителен к карбоплатину.

Изобретение также относится к способу лечения рака яичников, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфата (NUC-1031) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с карбоплатином, где доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, составляет от 250 до 1250 мг/м<sup>2</sup>, а доза карбоплатина, вводимого в каждом случае введения, выбрана для получения AUC от 2 до 5,5 мг/мл·мин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфат находится в форме свободного основания.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

В одном из вариантов осуществления настоящего способа рак рецидивирует.

В одном из вариантов осуществления настоящего способа рак является трудно поддающимся лечению, резистентным или частично резистентным к карбоплатину.

В одном из вариантов осуществления настоящего способа рак чувствителен к карбоплатину.

Лечение по настоящему изобретению основано на том факте, что комбинация двух средств (т.е. гемцитабин[фенил-бензоксид-*L*-аланинил]фосфата и карбоплатина) показывает большую эффективность при введении в комбинации, чем в случае самостоятельного введения.

Термин "в комбинации" или "вместе" в контексте настоящего изобретения относится к тому факту, что оба средства одновременно вводят одному и тому же пациенту в течение периода лечения. Введение может быть раздельным в том смысле, что дозы вводят раздельно, или введение может быть одной дозой. Введение может происходить одновременно или последовательно либо сразу один за другим, либо с временным интервалом между введением двух средств.

Термин "самостоятельно" или "отдельно" в контексте настоящего описания означает, таким образом, введение только одного активного средства без введения другого средства в течение периода лечения, даже после временного интервала.

Комбинированная терапия по изобретению предусматривает совместное введение или последовательное введение двух активных средств так, что улучшается общий терапевтический результат по сравнению с введением одного из активных средств отдельно в течение всего периода лечения. Фармацевтический(ие) состав(ы), используемый(е) для этой цели, может быть индивидуальным, т.е. отдельным составом, или представлен в одной смеси. Каждый состав может быть в жидкой форме, либо разведенный, либо готовой к разведению либо может быть в твердой форме. Твердые формы могут быть предназначены для растворения в подходящей среде растворителя. Твердые формы также могут быть представлены в виде концентрированной стандартной лекарственной формы в виде таблеток, капсул, пастилок и т.п.

В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что концентрации в плазме активного метаболита NUC-1031 dFdCTP (гемцитабин трифосфат) вскоре после введения значительно выше, если NUC-1031 вводят больным людям в комбинации с карбоплатином, характерным противораковым средством на основе платины, по сравнению с введением в отсутствие карбоплатина. Таким образом, использование двух средств в комбинации дает неожиданный синергетический эффект.

Положительный клинический результат и улучшенные фармакокинетические результаты, полученные с NUC-1031 в комбинации с карбоплатином, являются неожиданными по двум причинам: (i) средство NUC-1031 при отдельном введении достигало удивительно высоких уровней активного метаболита dFdCTP, который, как оказалось, достиг ферментативной насыщенности; и (ii) молекулярные

механизмы, лежащие в основе синергического эффекта, наблюдаемого для гемцитабина и платины, нельзя считать применимыми к NUC-1031.

(i) Фермент нуклеозиддифосфаткиназа (NDPK) превращает dFdCDP в dFdCTP. Считалось, что NUC-1031 насыщает фермент NDPK, потому что в клинике в качестве самостоятельного средства NUC-1031 дает 10-кратное повышение  $C_{\max}$  внутриклеточных уровней dFdCTP, чем средство гемцитабин, вводимое отдельно, и в 4 раза выше, чем гемцитабин в комбинации с карбоплатином при эквивалентной дозе. NUC-1031 преодолевает все основные механизмы резистентности, характерные для гемцитабина, давая высокие уровни dFdCDP, которые насыщают фермент NDPK. С другой стороны, гемцитабин является слабым источником субстрата для NDPK из-за ограниченного обратного захвата hENT1 (50% злокачественных опухолей имеют дефицит hENT1) и обширной деградации CDA (экспрессия CDA и активность повышена на 60% в злокачественных новообразованиях), а также из-за плохой активации dCK (dCK снижена на 30% при раковых новообразованиях). Поэтому, если в опухолевых клетках имеются эти три механизма резистентности, то на каждые 100 вводимые молекулы гемцитабина только 9 могут быть превращены в субстрат NDPK dFdCDP с образованием dFdCTP. Напротив, поскольку метаболизм NUC-1031 не зависит от этих ферментов, то можно ожидать, что из 100 молекул NUC-1031 все 100 могут стать источником субстрата для NDPK и насытить фермент.

(ii) Синергический эффект, наблюдаемый для гемцитабина и карбоплатина, объясняется увеличением уровня активного метаболита dFdCTP в 1,5 раза (van Moorsel et al., British Journal of Cancer, 1999, 80(7), 981-990), что было описано как результат улучшенной активности дезоксицитидинкиназы (dCK). При объединении с гемцитабином предполагаются два механизма на основе платины для увеличения dCK-опосредованных уровней dFdCTP. Первый клеточный механизм включает ингибирование рибонуклеотидредуктазы, фермента, ответственного за синтез дезоксицитидинтрифосфата (dCTP), который, как известно, ингибирует dCK (Vajetta et al., Annals of Oncology, 2003, 14, 242-247). При втором молекулярном механизме индуцированное платиной повреждение ДНК активирует процессы репарации вырезанного нуклеотидного сегмента, которые требуют дезоксирибонуклеотидов (dNTP). В свою очередь, активированы несколько ферментов, участвующих в синтезе dNTP, включая dCK (van Moorsel et al., 1999). NUC-1031 синтезируется как нуклеотидный аналог в монофосфатной форме, который обходит dCK-зависимое образование dFdCTP, и, следовательно, синергический эффект, наблюдаемый при объединении NUC-1031 и карбоплатина, по-видимому, возникает по другому и еще неизвестному пути.

Гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат может быть в смеси фосфатных диастереоизомеров или может быть (S)-эпимером или (R)-эпимером по существу в диастереомерно чистой форме. "По существу диастереомерно чистая" для целей настоящего изобретения определяется как диастереомерная чистота более чем приблизительно 90%. Если гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат находится по существу в диастереомерно чистой форме, то он может иметь диастереомерную чистоту более 95, 98, 99 или даже 99,5%.

В контексте настоящего изобретения злокачественное новообразование представляет собой рак яичников.

В некоторых случаях рак яичников может рецидивировать. В некоторых случаях рак яичников может трудно поддаваться лечению, быть резистентным или частично резистентным к карбоплатину. В некоторых случаях рак яичников может быть чувствительным к карбоплатину.

Гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат может быть в форме его фармацевтически приемлемой соли. Предпочтительно гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат находится в форме свободного основания.

Гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат и карбоплатин могут вводиться одновременно или их можно вводить последовательно. В том случае, если их вводят одновременно, их можно вводить в одном составе или их можно вводить в разных составах. В том случае, если их вводят последовательно, их можно вводить в тот же день или их можно вводить в разные дни в течение периода лечения. Возможно, что в некоторые дни в течение периода лечения гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат и карбоплатин вводят одновременно или в тот же день, а в другие дни программы лечения вводят только одно из средств.

Составы NUC-1031.

Гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат можно вводить парентерально, например внутривенно, подкожно или внутримышечно. Предпочтительно гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

Гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфат можно вводить парентерально в виде водного состава, который необязательно также содержит полярный органический растворитель, например DMA. В случае парентерального (например, внутривенного) введения состав предпочтительно также содержит полярный апротонный органический растворитель, например DMA.

Препарат может быть предназначен для разведения заранее определенным количеством незадолго до введения, т.е. за 48 ч (например, за 24, 12 или 2 ч) перед введением.

Препарат также может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых солубилизаторов, например фармацевтически приемлемые неионные солубилизаторы.

Солюбилизаторами также можно называть поверхностно-активные вещества или эмульгаторы. Типичные солюбилизаторы включают полиэтоксилированные жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот и их смеси. Подходящие солюбилизаторы могут представлять собой или содержать в составе полиэтоксилированное касторовое масло (например, продаваемое под торговым названием Kolliphor® ELP); или могут содержать полиэтоксилированную гидрокси-стеариновую кислоту (например, продаваемую под торговыми марками Solutol® или Kolliphor® HS15); или могут представлять собой или содержать в составе полиэтоксилированный (например, полиоксиэтилен (20)) сорбитан моноолеат (например, продаваемый под торговой маркой Твин® 80).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления состав содержит более чем один фармацевтически приемлемый солюбилизатор.

Состав также может содержать водный носитель. Состав может быть готов к введению, и в этом случае он обычно содержит водный носитель.

Состав может быть для парентерального, например для внутривенного, подкожного или внутримышечного, введения.

Предпочтительно состав предназначен для внутривенного введения. Введение можно проводить через центральную вену или его можно проводить через периферическую вену.

Общая доза гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата в составе, подходящем для введения, обычно составляет от 250 до 3 г, например от 1 до 2 г, например около 1,5 г.

Полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 30% или более по объему состава. Таким образом, полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 50% или более, например 60% или более по объему состава. Полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 95% или менее, по объему состава, например 90% или менее. Состав также может содержать водный носитель (например, физиологический раствор). Водный носитель может присутствовать в 50% или менее по объему композиции, например 30% или менее по объему препарата. Обычно водный носитель (например, физиологический раствор) будет составлять 5% или более, например 10% или более, по объему состава.

Концентрация гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата в растворе(ах) состава может составлять 500 мг или менее на 1 мл. Концентрация может составлять 100 мг или более на 1 мл. Предпочтительно концентрация может составлять от 200 до 300 мг, например от 225 до 275 мг, например около 250 мг на 1 мл.

Некоторые предпочтительные составы включают:

от 30 до 95% по объему DMA;

от 5 до 50 об.% водного носителя;

от 100 до 400 мг (например, от 100 до 300 мг) на 1 мл гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата.

Более предпочтительные составы включают:

от 70 до 90% по объему DMA;

от 10 до 30% по объему водного носителя (например, солевого раствора);

от 200 до 300 мг на 1 мл гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата.

Составы, описанные в предыдущих четырех абзацах, в которых полярный апротонный растворитель (например, DMA) присутствует в качестве основного компонента, могут, например, использоваться для введения гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата в виде смеси диастереоизомеров фосфата. Их также можно использовать для введения гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата в виде эпимера (S)-фосфата по существу в диастереомерно чистой форме. Составы, описанные в этих абзацах, могут быть использованы путем введения (например, путем инфузии или инъекции) состава без разведения перед введением. Их можно вводить через центральную вену.

Альтернативно, эти составы могут быть разведены с получением состава, подходящего для введения через периферическую вену.

Таким образом, полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 10% или более, например 20% или более по объему состава. Таким образом, полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 80% или более, например 60% или более по объему состава. Полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 40% или менее по объему состава.

Состав может также содержать один или несколько солюбилизаторов (например, одну или несколько полиэтоксилированных жирных кислот).

Один или несколько солюбилизаторов могут составлять 90% или менее по объему состава, например, 80% или менее по объему состава.

Обычно один или более солюбилизаторов будут составлять 30% или более, например, 50% или более или 60% или более по объему состава. Один предпочтительный состав включает лекарственное средство в виде раствора в смеси 30%:70% DMA:солюбилизатор.

Концентрация гемцитабин[фенил-бензоксид-L-аланинил]фосфата в растворе(ах) состава может составлять 200 мг или менее на 1 мл, например 150 мг или менее или 120 мг или менее. Концентрация мо-

жет составлять 40 мг или более на 1 мл, например 60 мг или более. Предпочтительно концентрация составляет от 70 г до 110 мг, например около 75 мг или около 100 мг на 1 мл.

Некоторые предпочтительные составы включают:

от 20 до 80% по объему DMA;

от 30 до 80% по объему солюбилизатора или солюбилизаторов;

от 50 г до 150 мг на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Состав также может содержать водный носитель, например, в количестве от 1 до 15% по объему.

Некоторые особенно предпочтительные составы включают:

от 20 до 80% по объему DMA;

от 20 до 60% по объему первого солюбилизатора;

от 5 до 40% по объему второго солюбилизатора;

от 2 до 12% водного носителя;

от 50 до 150 мг на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Первым солюбилизатором может быть полиэтокселированное касторовое масло (например, продаваемое под торговым названием Kolliphor® ELP). Второй солюбилизатор может представлять собой полиэтокселированный сорбитан моноолеат (например, который продается под торговой маркой Tween® 80). Состав также может содержать водный носитель, например, в количестве от 3 до 15% по объему.

Состав может содержать:

от 50 до 60% по объему DMA;

от 20 до 30% по объему первого солюбилизатора;

от 8 до 15% по объему второго солюбилизатора;

от 4 до 10% водного носителя; а также

от 75 до 125 мг на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Составы, описанные в предыдущих пяти абзацах, в которых полярный апротонный растворитель (например, DMA) присутствует в качестве основного компонента, могут использоваться, например, для введения гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в виде эпимера (S)-фосфата по существу в диастереоизомерной чистой форме. Их также можно использовать для введения смеси R- и S-эпимеров или R-эпимера. Составы, описанные в этих абзацах, обычно разводят водным носителем перед введением. После разведения их можно вводить через периферическую вену.

Эти составы могут быть получены путем разбавления состава, который не содержит солюбилизаторов. Гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат может разлагаться в присутствии некоторых солюбилизаторов.

Таким образом, полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 0,1% или более, например 0,5% или более или 1% или более по объему состава. Таким образом, DMA может составлять 10% или менее, например 5% или менее или 3% или менее по объему состава. Полярный апротонный растворитель (например, DMA) может составлять 8% или менее или 2% или менее по объему состава. Состав также может содержать водный носитель (например, WFI). Водный носитель может составлять 99,5% или менее по объему состава, например 99 или 98% менее по объему состава. Обычно водный носитель будет составлять 85% или более, например 90% или более или 95% или более по объему состава. Состав может также содержать один или несколько солюбилизаторов (например, одну или несколько полиэтокселированных жирных кислот). Один или несколько солюбилизаторов могут составлять 10% или менее по объему состава, например 7,5% или менее, или 5% или менее, или 3% или менее по объему состава. Обычно один или более солюбилизаторов будут составлять 0,1% или более, например 0,5% или более или 1% или более или 2% или более по объему состава.

Концентрация гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата в растворе(ах) состава может составлять 12,0 мг или менее на 1 мл, или 10,0 мг или менее на 1 мл, например 7,0 мг или менее, или 4,5 мг или менее на 1 мл. Концентрация может составлять 1,0 мг или более на 1 мл, например 2,0 мг или более. Предпочтительно концентрация составляет от 2,5 до 11 мг на 1 мл, например от 3 до 7 мг на 1 мл, например около 4,5 мг на 1 мл.

Некоторые предпочтительные составы включают:

от 0,1 до 15% (например, от 0,5 до 5%) по объему DMA;

от 0,1 до 15% (например, от 0,1 до 7,5%) по объему солюбилизатора или солюбилизаторов;

от 85 до 99% по объему водного носителя;

от 2,0 до 12,0 мг (например, от 2,0 до 10,0 мг) на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата.

Некоторые особенно предпочтительные составы включают:

от 0,5 до 10% по объему DMA;

от 0,2 до 4 об.% первого солюбилизатора;

от 0,1 до 2 об.% второго солюбилизатора;

от 85 до 99% по объему водного носителя; и

от 2,0 до 12,0 мг (например, от 2,0 до 10,0 мг) на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-

аланинил)]фосфата.

Первым солюбилизатором может быть полиэтокселированное касторовое масло (например, продаваемое под торговым названием Kolliphor® ELP). Вторым солюбилизатором может быть полиэтокселированный сорбитан моноолеат (например, который продается под торговой маркой Tween® 80).

Состав может содержать:

от 0,5 до 6% по объему DMA;

от 0,5 до 6% по объему первого солюбилизатора;

от 0,2 до 4.9% по объему второго солюбилизатора;

от 85 до 99% по объему водного носителя;

от 2,0 до 12,0 мг (например, от 2,0 до 10,0 мг) на 1 мл гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил)]фосфата.

Составы, описанные в предыдущих четырех абзацах, в которых полярный апротонный растворитель (например, DMA) присутствует в качестве второстепенного компонента, могут использоваться, например, для введения гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил)]фосфата в виде эписмера (S)-фосфата по существу в диастереоизомерной чистой форме. Их также можно использовать для введения смеси R- и S-эписмеров или R-эписмера. Составы, описанные в этих абзацах, обычно получают путем разбавления состава концентрированного полярного апротонного растворителя (например, DMA) или концентрированного полярного апротонного растворителя (например, DMA) и композиции солюбилизатора водным носителем за 48 ч до введения. Полученные составы можно вводить через периферическую вену.

Хотя гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил)]фосфат предпочтительно получают для парентерального введения, в некоторых вариантах осуществления изобретения его можно вводить перорально.

Любая из вышеупомянутых композиций может также содержать противораковое средство на основе платины.

Составы противоракового средства на основе платины.

Карбоплатин можно вводить парентерально, например внутривенно, внутривенно, подкожно или внутримышечно. Предпочтительно карбоплатин вводят внутривенно.

Карбоплатин обычно вводят в виде водного раствора, например в виде стерильного, не содержащего пирогенов 10 мг/мл водного раствора. Дополнительная информация по введению карбоплатина доступна, например, на одобренной США FDA инструкции для Paraplatin®.

Карбоплатин обычно вводят путем инфузии в вену, но его можно вводить и внутривенно. Если карбоплатин вводят внутривенно, то это можно осуществлять в течение от 15 до 60 мин или это можно осуществлять в течение более длительного периода, например, путем непрерывной внутривенной инфузии в течение 24 ч.

Режим дозирования.

Можно вводить NUC-1031 дважды в 21-дневном цикле. Можно вводить противораковое средство на основе платины (карбоплатин) один раз в 21-дневный цикл. В предпочтительном режиме дозирования NUC-1031 вводят в 1- и 8-й дни 21-дневного цикла, а противораковое средство на основе платины (карбоплатин) вводят в 1-й день 21-дневного цикла. Можно вводить NUC-1031 и противораковое средство на основе платины (карбоплатин) одновременно в 1-й день 21-дневного цикла.

Доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, предпочтительно составляет от 250 и 1250 мг/м<sup>2</sup>. Доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, может находиться от 300 до 1000 мг/м<sup>2</sup>. Доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, может находиться от 400 до 800 мг/м<sup>2</sup>. Доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, может составлять приблизительно 500 или приблизительно 750 мг/м<sup>2</sup>.

Дозу карбоплатина, вводимого в каждом случае введения, можно выбрать для получения AUC от 2 до 5,5 мг/мл-мин. Она может быть выбрана для получения AUC от 2,5 до 4,5 мг/мл-мин. Доза может быть достаточной для получения AUC приблизительно 3 или приблизительно 4 мг/мл-мин.

Доза NUC-1031 или доза противоракового средства на основе платины (карбоплатина) или доза обоих соединений может оставаться практически одинаковой в каждом цикле лечения. Например, доза NUC-1031, равная приблизительно 750 мг/м<sup>2</sup> на одно введение, и доза карбоплатина, выбранная для получения значения AUC, равная приблизительно 4 мг/мл-мин, могут использоваться в нескольких циклах лечения. Аналогично, доза NUC-1031, равная приблизительно 500 мг/м<sup>2</sup> на одно введение, и доза карбоплатина, выбранная для получения значения AUC, равная приблизительно 4 мг/мл-мин, могут использоваться в нескольких циклах лечения.

Альтернативно, доза NUC-1031 или доза противоракового средства на основе платины (карбоплатина) или доза обоих соединений может снижаться в промежутке от первого цикла лечения до второго (или последующих) цикла лечения. Например, доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, может снижаться от примерно 750 мг/м<sup>2</sup> в первом цикле лечения, до примерно 500 мг/м<sup>2</sup> во втором (или последующих) цикле лечения. Доза противоракового средства на основе платины (карбоплатина) может снижаться от дозы, выбранной для получения AUC, равного приблизительно 5 мг/мл-мин в первом цикле лечения, до дозы, выбранной для получения AUC приблизительно 4 мг/мл-мин, или AUC приблизительно

но 3 мг/мл-мин во втором (или последующем) цикле лечения.

В подходящих схемах лечения можно использовать уменьшение (как указано в предыдущем абзаце) обеих доз: доз NUC-1031 и дозах противоракового средства на основе платины (карбоплатина) в промежутке от первого цикла лечения до второго (или последующего) цикла лечения. Например, доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, может быть уменьшена от примерно 750 в первом цикле лечения до примерно 500 мг/м<sup>2</sup> во втором (или последующем) цикле лечения, а доза противоракового средства на основе платины (карбоплатина) может быть уменьшена от дозы, выбранной, чтобы получить значение AUC приблизительно 5 мг/мл-мин в первом цикле лечения, до дозы, выбранной для получения значения AUC приблизительно 4 мг/мл-мин, или дозы, выбранной для получения значения AUC приблизительно 3 мг/мл-мин во втором (или последующем) цикле лечения.

В том случае, если доза NUC-1031 уменьшается от первого ко второму или последующему циклу лечения (например, от примерно 750 мг/м<sup>2</sup> на один случай введения до примерно 500 мг/м<sup>2</sup> на один случай введения), доза противоракового средства на основе платины (карбоплатина) может оставаться неизменной в промежутке от первого до второго или последующих циклов лечения (например, доза, выбранная для получения значения AUC около 4 мг/мл-мин в каждом цикле).

В том случае, если доза NUC-1031 остается постоянной в промежутке от первого до второго или последующего цикла лечения (например, около 500 мг/м<sup>2</sup> на случай введения), доза противоракового средства на основе платины (карбоплатина) может быть уменьшена в промежутке между первым и вторым или последующими циклами лечения (например, от дозы, выбранной для получения значения AUC около 5 мг/мл-мин в первом цикле лечения, например, до дозы, выбранной для обеспечения значения AUC приблизительно 4 мг/мл-мин во втором или последующем цикле лечения).

Авторы изобретения обнаружили, что вышеуказанный режим введения дозы обеспечивает баланс, при котором токсичность каждого из компонентов комбинации находится на приемлемом уровне, но терапевтическая эффективность от комбинации все еще отмечается.

Вышеуказанный режим дозирования может давать улучшенный показатель выживаемости у пациентов. Он может приводить к стабильному заболеванию у более чем 50% пациентов. Он может давать снижение CA125 более чем на 50% у более чем 50% пациентов. Он может давать одно или несколько из вышеуказанных положительных эффектов при приемлемом уровне побочных эффектов. Дозирование может быть таким, что AUC dFdCTP выше для комбинации, чем для NUC-1031, вводимого в качестве единственного средства. Дозирование может быть таким, что отношение AUC к C<sub>max</sub> dFdCTP выше для комбинации, чем для NUC-1031, вводимого в качестве единственного средства.

#### **Краткое описание чертежей**

Варианты осуществления изобретения описаны далее со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

На фиг. 1 показан хроматограф для разделения соединений 3 и 4 с помощью ВЭЖХ с использованием колонки Chiralpak AD и системы растворителей n-гептан/IPA;

на фиг. 2 показана РК кривая зависимости концентрации от времени для внутриклеточного dFdCTP в РВМС после внутривенного введения NUC-1031, цикл 1, день 1 (n=11). Внутриклеточные концентрации были нормализованы в отношении концентраций тканевого белка. dFdCTP = 2',2'-дифтор-2'-деоксицитидин; РВМС = периферические мононуклеарные клетки крови;

на фиг. 3 показана РК кривая зависимости концентрации от времени для внутриклеточного dFdCTP в РВМС после внутривенного введения NUC-1031 и карбоплатина, цикл 1, день 1 (n=10). Внутриклеточные концентрации были нормализованы в отношении концентраций тканевого белка. dFdCTP = 2',2'-дифтор-2'-деоксицитидин; РВМС = периферические мононуклеарные клетки крови;

на фиг. 4 показано наложение РК кривых зависимости концентрации от времени для внутриклеточного dFdCTP в РВМС после внутривенного введения одного средства NUC-1031 и комбинированного режима NUC-1031 и карбоплатина, цикл 1, день 1. Внутриклеточные концентрации были нормализованы в отношении концентраций тканевого белка. dFdCTP = 2',2'-дифтор-2'-деоксицитидин; РВМС = периферические мононуклеарные клетки крови.

#### **Подробное описание изобретения**

"Одновременный" означает "по существу одновременный", например, с интервалом менее чем в 30 мин. "Последовательный" означает введение более чем через 30 мин.

По всему описанию термин S-эпимер или S-диастереоизомер относится к гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]-(S)-фосфату. Аналогично, по всему описанию термин R-эпимер или R-диастереоизомер относится к гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]-(R)-фосфату.

Соединения по изобретению могут быть получены, храниться и/или введены в виде фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но ими не ограничиваются, соли фармацевтически приемлемых неорганических кислот, таких как хлористоводородная, фосфорная, серная, азотная, карбоновая, борная, сульфаминовая и бромистоводородная кислоты, или соли фармацевтически приемлемых органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, бутановая, винная, малеиновая, гидроксималеиновая, фумаровая, яблочная, лимонная, молочная, муциновая, глюко-

новая, бензойная, янтарная, щавелевая, фенилуксусная, метансульфоновая, толуолсульфоновая, бензолсульфоновая, салициловая, сульфаниловая, аспарагиновая, глутаминовая, эдетовая, стеариновая, пальмитиновая, олеиновая, лауриновая, пантотеновая, танниновая, аскорбиновая и валериановая кислоты. Подходящие соли оснований получают из оснований, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамин и цинка. Также могут быть получены полусоли кислот и оснований, например соли гемисульфаты, гемиоксалаты и гемикальциевые. В некоторых вариантах осуществления, особенно тех, которые относятся к S-эпимеру, соединение находится в виде HCl соли или гемиоксалатной соли.

Соединения по изобретению могут существовать в виде монокристаллической формы или в виде смеси кристаллических форм или они могут быть аморфными. Таким образом, соединения по изобретению, предназначенные для фармацевтического применения, могут быть введены в виде кристаллических или аморфных продуктов. Они могут быть получены, например, в виде твердых прессованных масс, порошков или пленок, способами, такими как осаждение, кристаллизация, сушка вымораживанием, или распылительная сушка, или испарительная сушка. Для этой цели можно использовать микроволновую или радиочастотную сушку.

Для вышеупомянутых соединений по изобретению вводимая доза будет, разумеется, варьироваться в зависимости от используемого соединения, способа введения, желаемого лечения и указанного устройства. Например, если соединение по изобретению вводится парентерально, то дозировка соединения по изобретению может находиться в диапазоне от 0,1 до 5 г/м<sup>2</sup>, например от 0,5 до 2 г/м<sup>2</sup>. Размер дозы для терапевтических целей соединений по изобретению будет, естественно, в соответствии с хорошо известными принципами медицины варьироваться в зависимости от характера и тяжести состояния, возраста и пола пациента или животного и пути введения.

Предполагается, что уровни дозировки, частота приема лекарственного средства и продолжительность лечения соединениями по изобретению будут различаться в зависимости от состава и клинического показания, возраста и сопутствующих заболеваний пациента.

Соответствующие дозы для получения желаемого значения AUC карбоплатина могут быть рассчитаны с помощью формулы Калверта.

Соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемая соль могут использоваться сами по себе, но обычно они вводятся в виде фармацевтической композиции, в которой соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли находятся в ассоциации с фармацевтически приемлемым адьювантом, разбавителем или носителем. Обычные способы подбора и приготовления подходящих фармацевтических составов описаны, например, в "Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs", M.E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988.

В зависимости от метода введения соединений по изобретению фармацевтическая композиция, которая используется для введения соединений по изобретению, предпочтительно содержит от 0,05 до 99 мас.% соединений по изобретению, более желательно от 0,05 до 80 мас.% соединений по изобретению, еще больше желательно от 0,10 до 70 мас.% соединений по изобретению и даже более предпочтительно от 0,10 до 50 мас.% соединений по изобретению, все проценты даны по массе в расчете на весь состав.

Для перорального введения соединения по изобретению могут быть смешаны с адьювантом или носителем, например, лактозой, сахарозой, сорбитом, маннитом; крахмалом, например картофельным крахмалом, кукурузным крахмалом или амилопектином; производным целлюлозы; связующим, например желатином или поливинилпирролидоном; и/или смазывающим веществом, например стеаратом магния, стеаратом кальция, полиэтиленгликолем, воском, парафином и т.п., а затем спрессованы в таблетки. Если необходимы таблетки, покрытые оболочкой, ядра, подготовленные, как описано выше, могут быть покрыты концентрированным сахарным раствором, который может содержать, например, арабийскую камедь, желатин, тальк и диоксид титана. Альтернативно, таблетки могут быть покрыты подходящим полимером, растворенным в легколетучем органическом растворителе.

Для получения мягких желатиновых капсул соединения по изобретению могут быть смешаны, например, с растительным маслом или полиэтиленгликолем. Твердые желатиновые капсулы могут содержать гранулы соединения с использованием любого из вышеупомянутых эксципиентов для таблеток. Также твердые желатиновые капсулы могут быть заполнены жидкими или полутвердыми составами соединения по изобретению.

Жидкие препараты для перорального применения могут быть в виде сиропов или суспензий, например растворов, содержащих соединения по изобретению, а остальное представляет собой сахар и смесь этанола, воды, глицерина и пропиленгликоля. Необязательно такие жидкие препараты могут содержать красители, ароматизаторы, подсластители (такие как сахарин), консерванты и/или карбоксиметилцеллюлозу в качестве загустителя или другие наполнители, известные специалистам в данной области.

При парентеральном (например, внутривенном) введении соединения могут быть введены в виде стерильного водного или масляного раствора. Соединения по изобретению являются очень липофиль-

ными. Таким образом, водные составы, как правило, содержат также фармацевтически приемлемый полярный органический растворитель.

Для терапевтических целей размер дозы соединений по изобретению будет, естественно, варьироваться в зависимости от характера и тяжести состояния, возраста и пола пациента или животного и пути введения в соответствии с хорошо известными принципами медицины.

Предполагается, что уровни дозировки, частота приема лекарственного средства и продолжительность лечения соединениями по изобретению будут различаться в зависимости от состава и клинического показания, возраста и сопутствующих заболеваний пациента.

Во всем описании и в формуле данного изобретения слова "содержат" и "включают" и их вариации означают "включая, но не ограничиваясь", и они не предназначены для исключения (и не исключают) других фрагментов, добавок, компонентов, целых чисел или стадий. Во всем описании и формуле данного изобретения единственное число охватывает и множественное число, если контекст не требует иного. В частности, когда используется неопределенное указание, это следует понимать как рассмотрение множественности, а также сингулярности, если контекст не требует иного.

Признаки, целые числа, характеристики, соединения, химические фрагменты или группы, описанные в связи с конкретным аспектом, воплощением или примером по изобретению, следует понимать, как применимыми к любому другому аспекту, воплощению или примеру, описанным в настоящем документе, если они не являются с ним несовместимыми. Все признаки, раскрытые в данном описании (включая прилагаемые формулу изобретения, реферат и чертежи), и/или все стадии любого раскрытого метода или способа могут быть объединены в любой комбинации, за исключением комбинаций, в которых по меньшей мере некоторые из таких признаков и/или стадий являются взаимоисключающими. Изобретение не ограничивается деталями какого-либо из вышеприведенных вариантов осуществления. Изобретение распространяется на любой новый или любую новую комбинацию признаков, раскрытых в этом описании (включая прилагаемые формулу изобретения, реферат и чертежи), или на любую новую или любую новую комбинацию стадий любого способа или процесса, описанных таким образом.

Внимание читателя направлено на все научные статьи и документы, которые подаются одновременно с этим описанием или предшествуют этому описанию в связи с заявкой на данное изобретение и которые открыты для публичного ознакомления с этим описанием, и содержание всех таких научных статей и документов включено в настоящее описание посредством ссылки.

Пример 1. Отдельные диастереоизомеры NUC-1031 (R)- и (S)-изомеры могут быть разделены с помощью ВЭЖХ в следующих условиях:

Оборудование: Agilent™ серии 1200 с детектором DAD.

Скорость потока: 1 мл/мин.

Колонка: Chiralpak AD™; 250×4,6 мм вн. диам. (нормальная фаза).

Температура: комнатная.

Размер частиц: 20 мкм.

Загрузка: растворенное в метаноле; 10 г/л.

Растворитель: н-гептан/РА 10->50% изопропиловый спирт.

Хроматограмма представлена на фиг. 1.

(S)-эпимер элюировался на 8,6 мин, и (R)-эпимер элюировался на 10,3 мин.

Описание методов и материалов.

Сигналы протона (<sup>1</sup>H), углерода (<sup>13</sup>C), фосфора (<sup>31</sup>P) и фтора (<sup>19</sup>F) в спектрах ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance 500 при 25°C. Спектры были автоматически откалиброваны по пику дейтерированного растворителя, и все спектры <sup>13</sup>C ЯМР и <sup>31</sup>P ЯМР были с развязкой от протонов. Чистота конечных соединений была установлена как >95% с помощью ВЭЖХ-анализа с использованием Varian Polaris C18-A (10 мкМ) в качестве аналитической колонки с градиентным элюированием H<sub>2</sub>O/MeOH от 100/0 до 0/100 за 35 мин. Анализ ВЭЖХ проводили с помощью Varian Prostar (детектор LC Workstation-Varian prostar 335 LC).

2'-Деокси-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил (бензилокси-L-аланинил)]-(S)-фосфат 3:

(ES<sup>+</sup>) m/z, найдено: (M+Na<sup>+</sup>) 603,14. C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>NaP, необходимо: (M<sup>+</sup>) 580,47.

<sup>31</sup>P ЯМР (202 МГц, MeOD): δ<sub>p</sub> 3,66.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD): δ<sub>H</sub> 7,58 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-6), 7,38-7,32 (м, 7H, ArH), 7,26-7,20 (м, 3H, ArH), 6,24 (т, J=7,5 Гц, 1H, H-1'), 5,84 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-5), 5,20 (система АВ, J<sub>AB</sub>=12,0 Гц, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,46-4,43 (м, 1H, H-5'), 4,36-4,31 (м, 1H, H-5'), 4,25-4,19 (м, 1H, H-3'), 4,07-4,00 (м, 2H, H-4', CHCH<sub>3</sub>), 1,38 (д, J=7,2 Гц, 3H, CHCH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F ЯМР (470 МГц, MeOD): δ<sub>F</sub> -118,0 (д, J=241 Гц, F), -120,24 (широкий д, J=241 Гц, F).

<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, MeOD): δ<sub>C</sub> 174,61 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=5,0 Гц, C=O, сложный эфир), 167,63 (C-NH<sub>2</sub>), 157,74 (C=O основной), 152,10 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=7,0 Гц, C-Ar), 142,40 (CH-основной), 137,22 (C-Ar), 130,90, 129,63, 129,39, 129,32, 126,32 (CH-Ar), 124,51 (д, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub>=257 Гц, CF<sub>2</sub>), 121,47, 121,43 (CH-Ar), 96,67 (CH-основной), 85,92 (широкий сигнал, C-1'), 80,31 (C-4'), 71,27 (кажущийся т, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub>=23,7 Гц, C-3'), 68,03 (OCH<sub>2</sub>Ph), 65,73 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=5,30 Гц, C-5'), 51,66 (CHCH<sub>3</sub>), 20,42 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=6,25 Гц, CHCH<sub>3</sub>).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ, элюирование H<sub>2</sub>O/MeOH от 100/0 до 0/100 за 35 мин, показала один пик диастереоизомера с t<sub>R</sub>=22,53 мин.

2'-Деокси-2',2'-дифтор-D-цитидин-5'-O-[фенил (бензилокси-L-аланинил)]-(R)-фосфат 4:

(ES+) m/z, найдено: (M+Na<sup>+</sup>) 603,14. C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>NaP, необходимо: (M<sup>+</sup>) 580,47,

<sup>31</sup>P ЯМР (202 МГц, MeOD): δ<sub>p</sub> 3,83.

<sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, MeOD): δ<sub>H</sub> 7,56 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-6), 7,38-7,31 (м, 7H, ArH), 7,23-7,19 (м, 3H, ArH), 6,26 (т, J=7,5 Гц, 1H, H-1'), 5,88 (д, J=7,5 Гц, 1H, H-5), 5,20 (с, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,49-4,46 (м, 1H, H-5'), 4,38-4,34 (м, 1H, H-5'), 4,23-4,17 (м, 1H, H-3'), 4,07-4,01 (м, 2H, H-4', CHCH<sub>3</sub>), 1,38 (д, J=7,2 Гц, 3H, CHCH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F ЯМР (470 МГц, MeOD): δ<sub>F</sub> -118,3 (д, J=241 Гц, F), -120,38 (широкий д, J=241 Гц, F).

<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, MeOD): δ<sub>C</sub> 174,65 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=5,0 Гц, C=O, сложный эфир), 167,65 (C-NH<sub>2</sub>), 157,75 (C=O основной), 152,10 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=7,0 Гц, C-Ar), 142,28 (CH-основной), 137,50 (C-Ar), 130,86, 129,63, 129,40, 129,32, 126,31 (CH-Ar), 124,50 (д, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub>=257 Гц, CF<sub>2</sub>), 121,44, 121,40 (CH-Ar), 96,67 (CH-основной), 85,90 (широкий сигнал, C-1'), 80,27 (C-4'), 71,30 (кажущийся т, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub>=23,7 Гц, C-3'), 68,02 (OCH<sub>2</sub>Ph), 65,50 (C-5'), 51,83 (CHCH<sub>3</sub>), 20,22 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=7,5 Гц, CHCH<sub>3</sub>).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ, элюирование H<sub>2</sub>O/MeOH от 100/0 до 0/100 за 35 мин, показала один пик диастереоизомера с t<sub>R</sub>=21,87 мин.

Пример 2. Клиническое исследование комбинации NUC-1031 и карбоплатина на пациентах с рецидивирующим раком яичников.

Для оценки безопасности, фармакокинетики и клинической активности NUC-1031, даваемого в день 1 и 8 с карбоплатином, в день 1, q3-еженедельно для 6 циклов, у участников с рецидивирующим раком яичников проводили открытое исследование фазы IB с увеличением дозы.

Таблица 1

#### Демографическое резюме пациентов, получавших лечение в исследовании

Пациенты	10
Подлежащие оценке пациенты (завершено 3 цикла)	10
Возраст (средний)	62 (диапазон 37-77)
Предыдущие схемы химиотерапевтического лечения (среднее)	3,1 (диапазон 2-6)

Таблица 2

#### Краткое описание эффективности лечения

Полный ответ	10% (n=1)
Частичный ответ	10% (n=1)
Стабилизация заболевания	80% (n=8)
Частота контроля заболевания	100% (n=10)
Выживаемость без прогрессирования заболевания (ВПБ)	5,4+месяцы

Таблица 3

#### Краткое описание ответов пациента

Пациент	Возраст	Первичный диагноз	Предыдущая химия	Предыдущий Gem	ВПБ Месяцы	Циклы NUC-1031	Лучший ответ RECIST	SA 125				ВПБ Месяцы
								Контрольная группа	Самый низкий	Уменьшение	GCIG	
001	54	Степень 3, стадия 3b	2	N	7	6	Частичный ответ Все целевые поражения исчезли	218	27	88%	ЧО	9+
002	68	Степень 3, стадия 4	5	Y	0	6	Стабильное заболевание 14% уменьшение	865	377	56%	ЧО	7+
003	37	Степень 3, стадия 3b	6	Y	0	6	Стабильное заболевание 5% уменьшение	272	117	57%	ЧО	5
004	63	Степень 3, стадия 4	3	N	8	4,5	Стабильное заболевание 22% уменьшение	1 574	447	72%	ЧО	3
005	75	Степень 3, стадия 4	3	N	3	6	Стабильное заболевание 26% уменьшение	638	127	80%	ЧО	5+
006	70	Степень 3, стадия 3c	3	Y	0	6	Стабильное заболевание 28% уменьшение	48	25	48%	СЗ	6+
007	77	Крупноклеточный эндокринный	2	N	14	6	Полный ответ					5+

008	54	Степень 3, стадия 3с	2	У	7	6	Стабильное заболевание 28% уменьшение	791	23	97%	ЧО	5+
009	63	Степень 3, стадия 4	2	У	4	6	Стабильное заболевание 2% уменьшение	75	42	44%	СЗ	5+
010	76	Степень 3, стадия 3с	2	У	5	6	Стабильное заболевание	304	353	-	СЗ	4+

Пац. = пациент; химия = химиотерапия; Gem = гемцитабин; БПИ = бесплатиновый интервал; GCIG = интергруппа гинекологического рака; ЧО = частичный ответ; СЗ = стабильное заболевание; ВПБ = выживаемость без прогрессирования заболевания; +Выполняется при прекращении сбора данных.

Подробное описание каждого пациента и режим их лечения воспроизводятся ниже.

Пациентам, получавшим NUC-1031 (ацеларин), вводили его в виде медленной болюсной внутривенной инъекции в дни 1 и 8 21-дневной циклической схемы приема лекарств наряду с карбоплатином в 1-й день 21-дневной схемы приема лекарств. Каждый пациент получал до шести циклов лечения.

NUC-1031 был представлен в виде однократной внутривенной инъекции в прозрачном флаконе, содержащем 250 мг/мл NUC-1031 в растворе диметилацетамида (DMA) и нормального физиологического раствора в соотношении 80:20. Продукт представляет собой прозрачный желтый раствор, без наличия видимых частиц.

В исследовании большинство пациентов лечилось S-эпимером ацеларина. Несколько пациентов получали смесь 2:1 эпимеров S:R. Считается, что не существует какой-либо существенной фармакологической разницы между двумя эпимерами, но было обнаружено, что из S-эпимер легче составлять рецептуру.

Пациент 001.

Диагноз: Рецидивирующая, частично чувствительная к платине серозная карцинома яичника, стадия IIIb, степень 3. BRCA отрицательный. Бесплатиновый интервал (БПИ) 7 месяцев.

Возраст 54 года, PS=0.

Диагностирована в 2012 году. В мае 2012 г. была проведена первична циторедуктивная операция по удалению опухоли до полного макроскопического клиренса.

1. Проведено шесть циклов химиотерапии карбоплатин+паклитаксел (ICON 8) в октябре 2012 г.

2. Июль 2013 г. - январь 2014 г, получала шесть циклов карбоплатин+келикс в исследовании DESKTOP с группе пациентов с химиотерапией.

Сентябрь 2014 г.: прогрессирующее заболевание с увеличенными перитонеальными узелками и новыми метастазами в легких.

Включена в исследование 27 ноября 2014 г. NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC4, и исследование завершено (6 циклов). Пациентка чувствует себя по-прежнему хорошо.

Эффективность: ПЭТ-сканирование 12 декабря 2014 г. показало заметный ответ на исследуемое лекарственное средство с уменьшением размера и метаболической активности в целевых поражениях. Значительное снижение СА125, теперь при нормальных уровнях от исходного уровня 218. КТ-сканирование 21 января 2015 г. показало частичный ответ RECIST. Два целевых поражения полностью исчезли. Только одно нецелевое поражение остается "просто видимым". По окончании КТ исследования по-прежнему наблюдали частичный ответ.

Безопасность: Имелась небольшая аллергическая реакция на карбоплатин, контролируемая стероидами и антигистаминными препаратами.

Критерии оценки наилучшего ответа в ответе солидных опухолей (RECIST): Частичный ответ.

Лучший ответ GCIG: Частичный ответ уменьшение СА125 на 88% (218-27).

Пациент 002.

Диагноз: Рецидивирующая, трудно поддающаяся лечению платиной серозная папиллярная карцинома яичников, стадия IV, степень 3 (БПИ 0 месяцев). BRCA неизвестно.

Возраст: 68 лет, PS=0.

Диагностирована в 2010 году. Имелась в мае 2010 г. Субоптимальная операция по удалению опухоли 15 июня 2010 г. Предварительная обработка СА125 составляла 2,056.

1. Декабрь 2010 г.: Проведено шесть циклов карбоплатин+таксол.

2. Август 2011 г. - август 2012 г. Получала карбоплатин+паклитаксел+ингибитор PDGFR/плацебо в исследовании MORAB с последующим поддерживающей терапией ингибитором PDGFR/плацебо до признаков прогрессирования заболевания.

3. Март 2013 г.: Проведено шесть циклов гемцитабин+карбоплатин с последующей обработкой СА125 441.

4. Май-ноябрь 2013 г.: Получала шесть циклов пазобаниб+еженедельно паклитаксел, с последующей поддерживающей терапией пазобанибом до ноября (исследование PAZPET).

5. Июнь 2014 г.: Начат цикл карбоплатин+келикс, но заболевание прогрессировало после 4 циклов.

Включена в исследование 2 декабря 2014 г. NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC4, и исследование завершено (6 циклов).

Эффективность: В начале исследования быстрый рост СА125 с исходным уровнем 865, но в исследовании СА125 значительно снижался. Вагинальное кровотечение в начале лечения прекращалось после цикла 1. КТ-сканирование 10 февраля 2015 г. показало стабилизацию заболевания по RECIST с уменьшением SLD на 14%. По окончании исследования КТ показывало устойчивую стабилизацию заболевания по RECIST.

Безопасность: Повышенный ALT после C1 D1, и лечение было отложено на 1 неделю. C2 D8 откладывалось на 1 неделю из-за инфекции грудной клетки. C4 D8 пропущено из-за нейтропении (G4). Требовалось поддержание GCSF.

Наилучший ответ по RECIST: Стабильное заболевание (14%-ное уменьшение).

Лучший ответ GCIG: Частичный ответ уменьшение СА125 на 56% (865-377).

Пациент 003.

Диагноз: Рецидивирующая, трудно поддающаяся лечению платиной серозная карцинома яичников (БПИ 0 месяцев), стадия IIIb, степень 3. Мутации BRCA 1 и 2.

Возраст 37 лет, PS=1.

Диагностирована после первичной операции по циторедукции 16 марта 2010 г.

1. Август 2010 г.: Завершено шесть циклов адъювант карбоплатин+паклитаксел.

2. Февраль-август 2012 г.: Получала карбоплатин+паклитаксел+ингибитор PDGFR/плацебо (исследование MORAB) с последующей поддерживающей терапией MORAB до прогрессирования.

3. Сентябрь 2012 - февраль 2013 г.: Получала ежедневно пазопаниб и еженедельно паклитаксел в течение 6 циклов, а затем поддерживающую терапию пазопанибом в исследовании (PAZPET).

4. Июль 2013 г. - апрель 2014 г.: Получала ежедневно ингибитор плюс участвовала в 3-недельном исследовании с карбоплатином+паклитакселем (AKTRES) в течение 6 циклов, за которым следовал ежедневный прием ингибитора АКТ до прогрессирования заболевания.

5. Июнь-октябрь 2014 г.: Получала 4 цикла гемцитабин+карбоплатин до прогрессирования заболевания, при котором возникла обструкция кишечника. Была проведена колэктомия и резекция спаек и лечение перитонеального заболевания.

6. Ноябрь-декабрь 2014 г.: Получила два цикла липосомального доксорубина, но прием был прерван из-за прогрессирования заболевания.

Включена в исследование 21 января 2015 г. В 1 цикле получала NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC4. Дозу снижали для C2 D1 до 500 мг/м<sup>2</sup> NUC-1031 и AUC3 карбоплатина, и на этом завершали исследование.

Эффективность: Сканирование КТ 1-ого апреля 2105 года показало Стабильное заболевание по RECIST и уменьшение SLD на 5%. Значительное снижение СА125. Исследование КТ в конце исследования показало Прогрессирующее заболевание и 50% увеличение SLD от исходного уровня.

Безопасность: Лечение многократно откладывали из-за миелосупрессии: максимум тромбоцитопении G4 и нейтропении G4. Вынужденное отложение введения дозы, снижение дозы и GCSF. D8 был исключен из каждого цикла из C2 и далее. Два раза попадала в больницу с инфекцией.

Лучший ответ по RECIST: Стабильное заболевание (снижение на 5%).

Лучший ответ по GCIG: Частичный ответ сокращение СА125 на 57% (272-117).

Пациент 004.

Диагноз: Рецидивирующая серозная аденокарцинома правого яичника с частичной чувствительностью к платине (БПИ 8 месяцев), стадия IV, степень 3. Негативный BRCA.

Возраст: 64 лет, PS=0.

Диагностирована в мае 2012 г. после обнаружения новообразования в малом тазу и множественных метастазов в печени во время исследований абдоминальной боли. Биопсия печени под контролем КТ выявила серозную аденокарциному 3-й степени (ER+).

1. Май-ноябрь 2012 г.: Получила шесть циклов карбоплатин+паклитаксел+бевацизумаб (3 раза в неделю), но местный онколог посчитал, что заболевание неоперабельное.

Самостоятельно обратилась по поводу удаления печени, которая была проведена в январе 2013 г. и получила второе мнение относительно операбельности. В феврале 2013 г. была проведена запоздалая циторедуктивная операция, за которой последовали три цикла карбоплатин+паклитаксел+бевацизумаб, которые были завершены в мае 2013 г. Продолжалась поддерживающая терапия бевацизумабом до октября 2013 г.

2. Ноябрь 2013 г. - май 2014 г.: Получала шесть циклов карбоплатин+келикс (задержка одного лечения из-за нейтропении), осталось только внутривенное заболевание.

3. Август 2014 г.: Получала радиоэмболизацию Y-90 (Sirtex) для обеих долей печени.

Январь 2015 г.: КТ показало прогрессирование заболевания с метастазами в печени и брюшине и быстрый рост уровней СА125.

Включена в исследование 3 февраля 2015 г. Получала 1 дозу NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатина AUC5. Уменьшена до AUC4 с C2 D1 и прошла 1 цикл. NUC-1031 уменьшали до 500 мг/м<sup>2</sup> для C3 D1 и проводили еще 2 полных цикла. Карбоплатин снижали до AUC3 для цикла 5, получала 1 дозу.

Эффективность: ПЭТ-сканирование 24 февраля 2015 г. показало удовлетворительный метаболиче-

ский ответ и небольшое уменьшение объема опухоли. Сканирование КТ 8 апреля 2015 г. указало на стабильное заболевание по RECIST с уменьшением SLD на 22%. Значительное снижение СА125. Пациентка сообщила, что она больше не чувствует опухолевых узлов в печени и боль вокруг первичного опухолевого участка после С1 значительно уменьшилась. Сканирование КТ на 13/5 показало прогрессирующее заболевание с новыми поражениями.

Безопасность: Периодические нейтропения и тромбоцитопения, требующие отсрочки введения дозы, снижения дозы и GCSF. LFT постоянно повышалась из-за метастазов в печени.

Лучший ответ RECIST: Стабильное заболевание (снижение на 22%).

Лучший ответ GCIG: Частичный ответ СА125 77% (1574-356).

Пациент 005.

Диагноз: Рецидивирующая билатеральная серозная аденокарцинома яичника с резистентностью к платине (БПИ 3 месяца), стадия IV, степень 3. Статус BRCA неизвестен.

Возраст 75 лет, PS=1.

Диагностирована в декабре 2011 г. и проведена полная абдоминальная гистерэктомия, билатеральная сальпингоофоректомия и оментектомия.

1. Май 2012 г.: Получала 6 адъювантных циклов карбоплатин+паклитаксел.

2. Июнь-декабрь 2013 г.: Получала шесть циклов карбоплатин+келикс в группе пациентов с химиотерапией в исследовании DESKTOP.

3. Июль 2014 г. - январь 2015 г.: Получена 3-недельная терапия карбоплатином и паклитакселем с суточным приемом ингибитора АКТ с последующей поддерживающей терапией ингибитором АКТ до PD в исследовании AKTRES.

Включена в исследование 20 февраля 2015 г. NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC4 и исследование завершили.

Эффективность: В конце С3 КТ сканирование указало на стабильное заболевание по RECIST с уменьшением SLD на 26%. Значительное снижение СА125. В конце исследования КТ сканирование показало устойчивое стабильное заболевание по RECIST.

Безопасность: С2 D1 была задержана из-за нейтропении (G3). Поступала в больницу с инфекцией. Усталость (G1).

Лучший ответ по RECIST: Стабильное заболевание (снижение на 26%).

Лучший ответ по GCIG: Частичный ответ сокращение СА125 на 80% (638-127).

Пациент 006.

Диагноз: Рецидивирующая серозная аденокарцинома яичника, трудно поддающаяся лечению платиной (БПИ 0 месяцев), стадия IIIc, степень 3. Статус BRCA неизвестен.

Возраст 70 лет, PS=1.

Диагностирована в сентябре 2012 г.. Проведена сверхрадикальная хирургия 4 октября 2012 г., частично сохраняя болезнь.

1. Март 2013 г.: Получено шесть циклов карбоплатина.

2. Ноябрь 2013 г. - апрель 2014 г. Получено шесть циклов еженедельного паклитаксела.

3. Июль-сентябрь 2014 г.: Получено три цикла карбоплатин+гемцитабин, но с прогрессирующим заболеванием.

Включена в исследование 20 февраля 2015 г.. NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC4 и до даты было завершено 4 цикла. Дозу NUC-1031 уменьшали до 500 мг/м<sup>2</sup> и AUC4 для С5 D1 и еще один цикл был завершен.

Эффективность: КТ сканирование после С3 показало, что болезнь стабилизировалась по RECIST с уменьшением SLD на 28%. Значительное сокращение СА125, теперь нормальное от базовой линии 48.

Безопасность: С2 D1 откладывали из-за нейтропении (G2). Боль увеличивалась, но в основном из-за низкого приема опиоидов. Поступила в больницу с инфекцией грудной клетки.

Была госпитализирована для хирургической операции ущемленной грыжи. Получала и КТ сканирование при восстановлении.

Лучший ответ: Стабильное заболевание (снижение на 28%).

Лучший ответ по GCIG: Устойчивое снижение СА125 на 48% (48-25).

Пациент 007.

Диагноз: Рецидивирующая, чувствительная к платине крупноклеточная нейроэндокринная опухоль, происходящая из яичников (БПИ 14 месяцев), стадия IIb. BRCA неизвестно; экспрессии СА125 нет.

Возраст 77 лет, PS=1.

Диагностирована в ноябре 2011 г. Получила циторедукцию без остаточного заболевания.

1. Март 2012 г.: Завершено шесть циклов адъювантного карбоплатина+этопозид.

2. Июль-ноябрь 2013 г.: Завершено шесть циклов 3-недельного карбоплатин+паклитаксел до CR.

Январь 2015 г.: КТ показало прогрессирующее увеличение лимфоузлов.

Включена в исследование 25 февраля 2015 г. NUC-1031 750 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC4 и до даты было завершено 4 цикла.

Эффективность: КТ сканирование после С3 показало частичный ответ по RECIST с уменьшением

SLD на 50%. КТ сканирование в конце исследования показало полный ответ по RECIST и исчезновение всех целевых и нецелевых поражений.

Безопасность: С2 D1 откладывали из-за нейтропении (G2). Запор G2 (связанный с противорвотным средством). После С4 принимали с нейтропенией G4 и инфекцией. Доза уменьшена для цикла 5.

Лучший ответ по RECIST: Полный ответ.

Не экспрессирует CA125.

Пациент 008.

Диагноз: Рецидивирующая серозная аденокарцинома яичника с частичной чувствительностью к платине (БПИ 7 месяцев), стадия IIIc, степень 3. Статус BRCA неизвестен.

Возраст 54 года, PS=0.

Диагностирована серозная аденокарцинома яичников на нециторедуктивной стадии IIIc, степень 3, после лапароскопии с биопсией, осуществленной 27 марта 2012 г.

1. Сентябрь 2012 г.: Завершено шесть циклов карбоплатин+паклитаксел в исследовании ICON8, но болезнь осталась неоперабельной.

2. Май 2014 г.: Начала прием карбоплатина, гемцитабина и бевацизумаба, но получила только один цикл до отказа от дальнейшей химиотерапии.

Февраль 2015 г.: Вернулась с симптоматической прогрессией, КТ-прогрессирующее перитонеальное заболевание, быстрый рост CA125.

Включена в исследование 10 марта 2015 г. NUC-1031 500 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC5 и полные три цикла к настоящему моменту. Карбоплатин был уменьшен до AUC4 для цикла 4, и пациентка получала еще два цикла.

Эффективность: КТ сканирование после С3 показало стабильное заболевание по RECIST и уменьшение SLD на 15%. Значительное снижение CA125. КТ сканирование в конце исследования показало стабильное заболевание и уменьшение SLD на 28%.

Безопасность: Усталость (G1). С3 D8 пропустила из-за нейтропении (G2). Уменьшен до AUC4 для цикла 4.

Лучший ответ по RECIST: Стабильное заболевание (снижение на 28%).

Лучший ответ по GCIG: Частичный ответ сокращение CA125 на 97% (791-23).

Пациент 009.

Диагноз: Рецидивирующая серозная аденокарцинома яичника с резистентностью к платине (БПИ 4 месяца), стадия IV, степень 3. Мутация BRCA1.

Возраст 63 года, PS=0.

Диагностирована после ультразвуковой биопсии 7 декабря 2012 г.

1. Январь 2013 г.: Получала неоадьювантный карбоплатин+паклитаксел на исследовании ICON 8 и после 3-го цикла перенесла первичную циторедуктирующую хирургию 26 февраля 2013 г. Хирургия была ультраагрессивной и включала переднюю резекцию прямой кишки, спленэктомию, удаление брюшины и диссекцию лимфатических узлов. Завершено четыре цикла послеоперационной химиотерапии с карбоплатином и доцетакселом (из-за аллергии на паклитаксел).

2. Май 2014 г. Получала карбоплатин, гемцитабин и P53-нацеливающее средство (APR-243) в исследовании PISARRO, с частичным ответом.

Февраль 2015 г.: рецидив болезни.

Включена в исследование 13 марта 2015 г. NUC-1031 500 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC5 и полные четыре цикла к настоящему моменту. Карбоплатин снижали до AUC4 для С5.

Эффективность: КТ сканирование после С3 показало стабильное заболевание по RECIST и уменьшение SLD на 2%. Значительное снижение CA125. В конце исследования КТ сканирование показало устойчивое стабильное заболевание по RECIST.

Безопасность: Усталость G1 (базовая линия G1). Присутствовала в С4 D8 с нейтропенией, G2. D8 пропущено, а карбоплатин уменьшен до AUC4.

Лучший ответ по RECIST: Стабильное заболевание (снижение на 2%).

Лучший ответ по GCIG: Стабильная болезнь, сокращение CA125 на 44% (75-42).

Пациент 010.

Диагноз: Рецидивирующая серозная карцинома яичника с резистентностью к платине (БПИ 5 месяца), стадия IIIc, степень 3.

Возраст 76 лет, PS=1.

Диагностирована в феврале 2013 г., была проведена правая сальпингооректомия и оментектомия, оставлены субсантиметровый слой остаточного перитонеального заболевания. Уровень CA125 до лечения составлял 930.

1. Апрель-август 2013 г.: полные шесть циклов карбоплатина и таксола в группе больных 3 исследования ICON 8.

2. Бессимптомный рост CA125 в феврале 2014 г. В июне 2014 г. начала прием гемцитабин+карбоплатин+бевацизумаб.

3. Начала поддерживающую терапию бевацизумабом в ноябре 2014 г. Прекратила в марте 2015 г.

из-за увеличения CA125.

Включена в исследование 15 апреля 2015 г. NUC-1031 500 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин AUC5 и полные четыре цикла к настоящему моменту.

Эффективность: КТ сканирование после С3 показало стабильное заболевание по RECIST. CA125 увеличился с 304 базовой линии до 515 в конце цикла 3. В конце исследования КТ сканирование показало устойчивое стабильное заболевание по RECIST.

Безопасность: Хорошо переносила лечение.

Лучший ответ по RECIST: Стабильная болезнь.

Лучший ответ по GCIG:

Пример 3. Фармакокинетический анализ концентраций dFdCTP из клинического исследования PRO-002 (NUC-1031 в комбинации с карбоплатином) и сравнение с результатами клинического исследования ProGem1 (только NUC-1031).

Материалы и методы.

1. Материалы

dFdCTP получали от Biorbyt, UK. Lymphoprep от STEMCELL Technologies Inc., UK. Перхлорную кислоту (PCA), ацетат аммония (NH<sub>4</sub>Ac) и аммиак получали от Sigma Aldrich, UK. LC-MS градиент вода, метанол, ацетонитрил и муравьиная кислота получали от Fisher Scientific, UK.

2. Методика.

А) Кровь собирали и получали PBMC: 6 мл крови собирали, используя гепаринизированную пробирку для сбора крови. После центрифугирования и отделения плазмы собирали лейкоцитарную пленку и переносили в новую пробирку, содержащую 3 мл градиента плотности Lymphoprep. После центрифугирования верхний слой, содержащий слой PBMC, переносили в новую пробирку. После промывки забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) PBMC повторно суспендировали в 100 мкл PBS. Затем добавляли еще 100 мкл 0,8 М PCA и смесь перемешивали на Vortex и центрифугировали, а затем переносили 100 мкл супернатанта в новую пробирку. Экстракты PCA хранили при -80°C до анализа.

В) Образцы экстрагировали (PBMC): Экстракты PCA буферизировали, используя 50 мкл 1 М NH<sub>4</sub>Ac, затем нейтрализовали, используя 20 мкл 10% раствора аммиака. Наконец, затем добавляли 5 мкл содержащего внутренний стандарт 8-хлорАТФ и 5 мкл деионизированной воды. Экстракты переносили в пробирки LC-MS и 10 мкл вводили в систему UPLC-MS/MS.

3. Хроматографический метод и анализ проб.

Готовили 10 мг/мл исходного раствора аналита и аликвоту замораживали при -80°C перед применением. Аналит восстанавливали, используя ультраэффективную жидкостную хроматографическую систему (Accela UPLC, Thermo Scientific, UK), оснащенную колонкой Biobasic AX, 5 мкм, 50×2,1 мм (Thermo Electron Corporation, Murrieta, CA, США) и мобильной фазой, состоящей из смеси 10 мМ NH<sub>4</sub>Ac в ACN/H<sub>2</sub>O (30:70 об./об.), pH 6,0 (А) и 1 мМ NH<sub>4</sub>Ac в ACN/H<sub>2</sub>O (30:70 об./об.), pH 10,5 (В). Использовали подвижный фазовый градиент, содержащий буфер А=95% в период 0-0,5 мин, 95-0% в течение 1,25 мин, поддерживали при 0% в течение 1,75 мин, 0-95% в течение 0,1 мин, заканчивая 95% в течение 2,9 мин, при скорости потока 500 мкл/мин.

4. Анализ масс-спектрометрии.

Представляющие интерес элюирующие соединения обнаруживали с использованием трехступенчатой квадрупольной системы масс-спектрометрии Vantage (Thermo Scientific, UK), оснащенной источником электрораспыления ионов. Образцы анализировали мониторингом множественных реакций (MRM), режим положительных (+ve) и отрицательных (-ve) ионов при напряжении распыления 3500 и 3000 В соответственно. Азот использовался в качестве защитного и вспомогательного газа при скорости потока 50 и 20 произвольных единиц соответственно. Аргон использовали в качестве газа для соударений с давлением 1,5 мторр.

Результаты.

Одно средство NUC-1031 вызывало быстрое и продолжительное внутриклеточное аккумулялирование активного метаболита дифтордиоксицитидинтрифосфата (dFdCTP) с максимальной концентрацией dFdCTP (C<sub>max</sub>), равной 11,3 мкМ/мг, тканевого белка (TP) при T<sub>max</sub> 1 ч окончания инфузии (EOI) и кажущегося t<sub>1/2</sub>, равного 9,6 ч. Эти данные показывают способность NUC-1031 освобождать очень высокие и устойчивые уровни активного противоракового метаболита dFdCTP. Внутриклеточная область под кривой концентрации (AUC) для dFdCTP составила 103,3 мкМ/мгTP·ч в течение первых 24 ч EOI (фиг. 2).

Комбинированный режим NUC-1031 с карбоплатином проводили 10 пациентам с раком яичников в рамках исследования фазы Ib PRO-002. Внутриклеточный C<sub>max</sub> dFdCTP достигал 15,1 мкМ/мгTP, а AUC составил 235,0 мкМ/мгTP·ч в течение первых 24 ч EOI (фиг. 3). Средние фармакокинетические параметры, нормированные до 500 мг/м<sup>2</sup>, дозы гемцитабина показаны в табл. 4 и сравниваются с данными, полученными у пациентов ProGem1 с раком яичников, подвергнутых воздействию одного средства NUC-1031.

Таблица 4  
Сравнение средних РК параметров в исследовании ProGem1 и PRO-002

Средние параметры РК (нормализованные до дозы 500 мг/м <sup>2</sup> гемцитабина)		
	ProGem1 (n=11) (NUC-1031 в качестве одного средства)	PRO-002 (n=10) (NUC-1031 в комбинации с карбоплатином)
C <sub>max</sub> (мкМ/мгТР)	11,3	15,1
T <sub>max</sub> (час)	1	2
AUC <sub>0-24</sub> (мкМ/мгТР.час)	103,3	235
Кажущееся t <sub>1/2</sub> (час)	9,6	20,3
Клиренс (л/ч)	3,9	1,2

#### Обсуждение.

Фармакокинетика одного средства NUC-1031 (ProGem1) была очень благоприятной, достигая внутриклеточных концентраций C<sub>max</sub> dFdCTP примерно в 10 раз выше, чем у гемцитабина. Комбинированный режим NUC-1031 с карбоплатином (PRO-002) показал повышение внутриклеточного C<sub>max</sub> на 34% и повышение AUC<sub>0-24</sub> на 127% по сравнению с одним средством. Синергизм, наблюдаемый на уровнях dFdCTP после лечения NUC-1031 и карбоплатином, имеет значительные потенциальные клинические последствия, включая более широкую клиническую ценность для лечения злокачественных новообразований, где высокие внутриклеточные уровни dFdCTP необходимы для блокирования роста опухоли и для лечения рецидивов злокачественных новообразований после применения одного средства.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата (NUC-1031) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака яичников в комбинации с карбоплатином, где доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, составляет от 250 до 1250 мг/м<sup>2</sup>, а доза карбоплатина, вводимого в каждом случае введения, выбрана для получения AUC от 2 до 5,5 мг/мл-мин.

2. Применение по п.1, где гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат находится в форме свободного основания.

3. Применение по п.1 или 2, где гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

4. Применение по любому из пп.1-3, где рак рецидивирует.

5. Применение по любому из пп.1-4, где рак является трудно поддающимся лечению, резистентным или частично резистентным к карбоплатину.

6. Применение по любому из пп.1-4, где рак чувствителен к карбоплатину.

7. Способ лечения рака яичников, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфата (NUC-1031) или его фармацевтически приемлемой соли в комбинация с карбоплатином, где доза NUC-1031, вводимая в каждом случае введения, составляет от 250 до 1250 мг/м<sup>2</sup>, а доза карбоплатина, вводимого в каждом случае введения, выбрана для получения AUC от 2 до 5,5 мг/мл-мин.

8. Способ по п.7, где гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат находится в форме свободного основания.

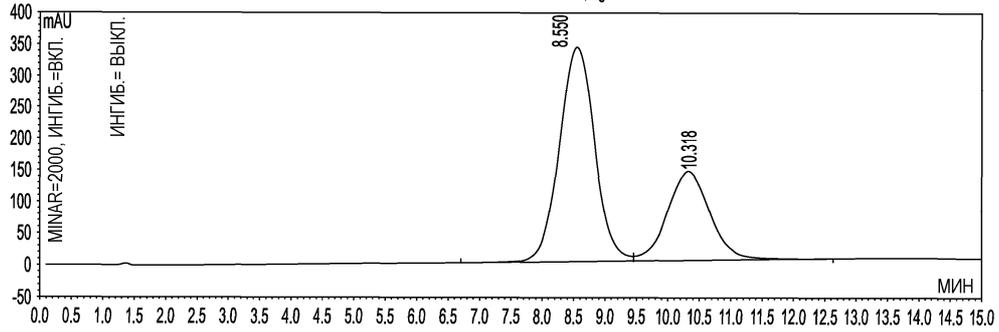
9. Способ по п.7 или 8, в котором гемцитабин[фенил-бензокси-L-аланинил]фосфат вводят внутривенно.

10. Способ по любому из пп.7-9, где рак рецидивирует.

11. Способ по любому из пп.7-10, где рак является трудно поддающимся лечению, резистентным или частично резистентным к карбоплатину.

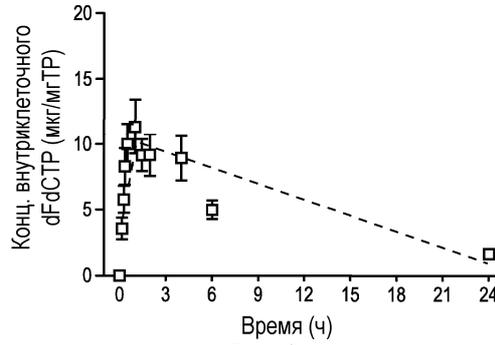
12. Способ по любому из пп.7-9, где рак чувствителен к карбоплатину.

20130521 ХИРАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ 1А G2419 ГЕПТАН ЕТСН ІРА САН #8 РАЦЕМАТ ДЛЯ НУСБ 2 Г/Л В ЕТСН



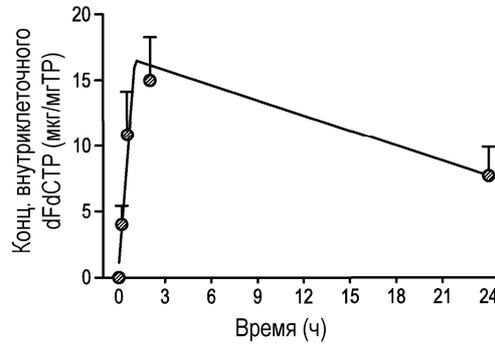
Фиг. 1

Группы яичников  
Progem 01 (n=11)

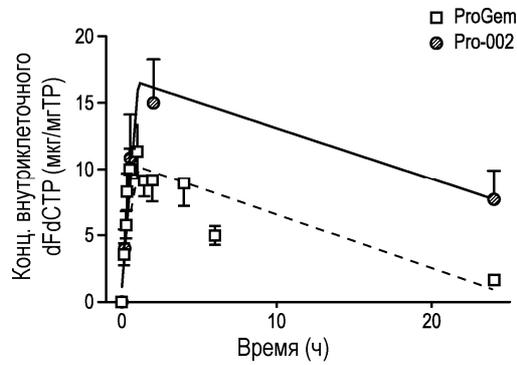


Фиг. 2

Progem 02  
(n=10)



Фиг. 3



Фиг. 4

